

VĚDECKÉ SPISY VYSOKÉHO UČENÍ TECHNICKÉHO V BRNĚ

*Edice Habilitační a inaugurační spisy, sv. 632*

*ISSN 1213-418X*

**Filip Mravec**

**FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE  
VE VÝZKUMU KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ**

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
Fakulta chemická  
Ústav fyzikální a spotřební chemie

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

# FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE VE VÝZKUMU KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ

FLUORESCENT SPECTROSCOPY IN RESEARCH  
OF COLLOIDAL SYSTEMS

ZKRÁCENÁ VERZE HABILITAČNÍ PRÁCE  
V OBORU  
FYZIKÁLNÍ CHEMIE



BRNO 2019

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

fluorescence; koloidy; kvantové tečky; tenzidy

## **KEYWORDS**

fluorescence; colloids; quantum dots; surfactants

## **MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE:**

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická

© Filip Mravec, 2019

ISBN 978-80-214-5759-1

ISSN 1213-418X

# OBSAH

1	PŘEDSTAVENÍ AUTORA.....	4
2	ÚVOD.....	5
3	OBECNĚ I PRAKTICKY O FLUORESCENCI VE VÝZKUMU KOLOIDŮ .....	5
3.1	FLUORESCENČNÍ CHARAKTERISTIKY.....	5
3.1.1	Stokesův posun .....	6
3.1.2	Anisotropie .....	7
3.1.3	Doba života .....	7
3.1.4	Intenzita fluorescence .....	7
3.1.5	Fluktuace fluorescence .....	8
3.2	NÁVRH OBECNÉHO STUDIA AGREGAČNÍCH PROCESŮ .....	9
3.3	OMEZENÍ, PROBLÉMY... A JEJICH MOŽNÉ ŘEŠENÍ.....	12
3.3.1	Excitace a detekce .....	12
3.3.2	Kompenzace rozptylu a vysoké koncentrace fluoroforů .....	12
3.3.3	Příprava vzorků pro spektroskopii .....	14
3.4	PYREN JAKO FLUORESCENČNÍ SONDA.....	16
4	VYBRANÉ APLIKACE FLUORESCENCE VE VÝZKUMU KOLOIDŮ .....	18
4.1	Nativní hyaluronan.....	18
4.2	Deriváty hyaluronanu .....	21
4.3	Interakce polymerů a amfifilních molekul .....	24
4.3.1	Interakce polyelektrolytů a opačně nabitých tenzidů .....	25
4.3.2	Fázová separace v systému polymer-tenzid za vysokých koncentrací.....	28
4.3.3	Interakce v systému polymer-lipid .....	30
4.4	Fluorescentní částice .....	32
4.4.1	Nanodiamanty .....	32
4.4.2	Kvantové tečky .....	33
4.5	Biokoloidní systémy.....	34
4.5.1	Strukturní studie .....	35
4.5.2	Studie cytoplazmy .....	36
4.5.3	UV protektivita .....	37
5	ZÁVĚR.....	38
6	ABSTRACT .....	39

# 1 PŘEDSTAVENÍ AUTORA

**Filip Mravec** se narodil roku 1981 v Ostravě-Vítkovicích. Po střední škole vystudoval Fakultu chemickou VUT, kde absolvoval v roce 2004 obor Spotřební chemie. Poté nastoupil k doktorskému studiu oboru Fyzikální chemie pod vedením prof. Miloslava Pekaře, které zakončil v roce 2008 obhajobou disertační práce "*Aggregation Behaviour of Polysaccharides in Aqueous Solutions*".

Mezi roky 2004-2009 byl na pozici výzkumník ve firmě CPN spol. s.r.o. a od roku 2010 je odborným asistentem na Vysokém učení technickém v Brně, Fakultě chemické, Ústavu fyzikální a spotřební chemie.

Odborné zaměření je rozděleno do dvou oblastí. Jednou z nich je zaměření na popis chování a vlastností biopolymerů (hyaluronan, dextran, polyhydroxybutyrát) a jejich aplikace v medicíně a farmacii. Předmětem intenzivního zkoumání jsou interakce mezi těmito polymery a nízkomolekulárními látkami, které povedou k systémům pro cílenou distribuci léčiv. Z dalších aplikací biopolymerů jsou v současnosti intenzivně zkoumány hydrogely na bázi fázové separace s uvažovanou aplikací v hojení ran.

Druhou odbornou oblastí je oblast fluorescenční spektroskopie se zaměřením na fluorescenční mikroskopické techniky jako fluorescenční korelační spektroskopie – časově rozlišená, dvouohnisková, dvoubarevná a dvoufotonová, časově rozlišené zobrazování, anizotropní zobrazování, techniky rezonančního přenosu energie a jejich aplikace v zobrazování. Všechny tyto techniky jsou využívány nejen ve studiu nosičových systémů a hydrogelů, ale mají přesah i do dalších výzkumných směrů jako je výzkum nanodiamantů, kvantových teček nebo výzkumu DNA.

## 2 ÚVOD

Tato habilitační práce si dala za cíl popsat využití jevu fluorescence v různě složitých koloidních systémech, které zahrnují jak micely, tak různé části živých systémů na buněčné úrovni. Autor habilitační práce k těmto oběma tématům přistupuje s respektem k jejich šíři, a proto se v této práci objeví některé vybrané a zobecněné principy, jak kvantově mechanický jev pomáhá v odhalování vlastností a zákonitostí v živých i neživých systémech.

## 3 OBECNĚ I PRAKTICKY O FLUORESCENCI VE VÝZKUMU KOLOIDŮ

Fluorescence je jev, který je spjatý s konkrétními částicemi zvanými fluorofory. V předchozí větě je záměrně užito slova „částice“, protože fluorofory mohou být celé organické molekuly, části organických supramolekul nebo např. různé druhy krystalů. Tyto částice jsou obklopeny svým okolím, které je více či méně ovlivňuje. Pokud je toto ovlivnění známo a je kvantifikovatelné pomocí dané fluorescenční charakteristiky, stává se z daného fluoroforu silný nástroj ke zkoumání vlastností právě tohoto okolí. Je potřeba mít však stále na mysli, že fluorofory jsou ovlivňovány lokálním prostředím a že během standardních experimentů dostáváme výsledné charakteristiky jako kombinaci signálu ze všech prostředí, typů okolí, ve kterých se daný fluorofor nachází. Naštěstí v tomto i jiných případech si fluorescenční spektroskopie dokáže poradit, a dokonce tato spektra od sebe oddělit (např. technika časově rozlišená emisní spektroskopie). Lokálnost fluoroforu lze vymezit oběma směry, a to pomocí jevů, kdy se excitovaná energie z fluoroforu ztratí. První z nich je tvorba excitovaných dimerů (obecně excitovaných komplexů), kdy například u látky pyren byla stanovena vzdálenost 0,353 nm<sup>1</sup>. Obecně tak nejmenší vzdálenost pro ovlivnění fluoroforu lze definovat jako rovnovážný bod, kdy ještě nedochází k repulzi elektronových obalů. Největší vzdálenost, kdy se ovlivňuje konkrétní fluorofor, pak může být vzata z dosahu jevu rezonančního přenosu energie, kdy může být fluoroforu odebrána excitovaná energie až na vzdálenost 10 nm (100 Å). Samostatnou kapitolou pak budou jevy, které ovlivňují fluorofor vázaný na supramolekulární komplex větší než 10 nm a zabraňují například rotaci toho komplexu.

### 3.1 FLUORESCENČNÍ CHARAKTERISTIKY

Jako fluorescenční charakteristiky míníme vlastnosti světla emitovaného příslušným fluoroforem nebo fluorescenční částicí. Jednotlivý foton má dvě základní charakteristiky – energii (vlnovou délku) a rovinu polarizace vůči námi stanovenému vztažnému systému. Soubor fotonů ze skupiny fluoroforů pak má pak širší distribuci energií i rovin polarizace. Ty odpovídají energetické a časové náročnosti nezářivých

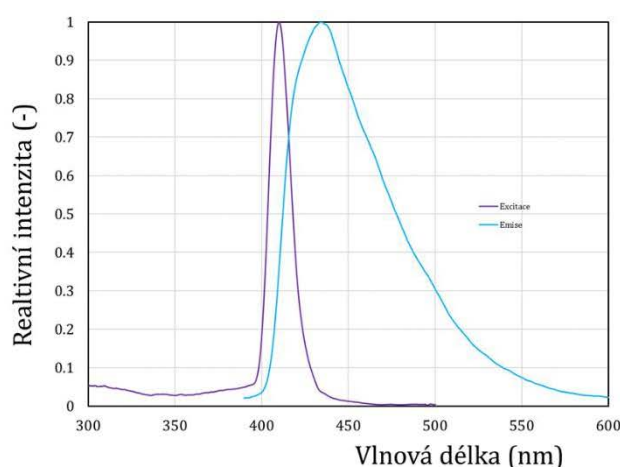
---

<sup>1</sup> Mezirovinná vzdálenost dimeru dle Birks, J. B. *Rep Prog Phys* 38 (1975), 903-974

procesů v excitovaném stavu (různé druhy relaxace, přenosu náboje) a pravděpodobnosti zářivých přechodů z nejnižšího vibračního stavu prvního excitovaného stavu (i relaxovaného) na různé vibrační hladiny základního stavu – Kashovo pravidlo. Rozložení pravděpodobnosti (četnosti) přechodu pro jednotlivé energie emitovaných fotonů označujeme jako emisní spektrum a distribuci rovin polarizace pak zjednodušíme promítnutím jednotlivých rovin do dvou základních rovin – horizontální (x-y rovina) a vertikální (y-z rovina).

### 3.1.1 Stokesův posun

Výše uvedené charakteristiky budou platné pro všechny druhy luminiscence i radiace bez ohledu na excitační mechanismus. Pokud je zdrojem excitace



Obrázek 1 Absorpční a emisní spektrum komerčního optického zjasňovacího prostředku Leucophor SAC (Archroma). Vpravo fotky roztoků komerčních OZP Leucophor.

elektromagnetické záření, pak můžeme porovnat energetickou ztrátu emitovaného světla neboli energetickou náročnost nezářivých procesů, porovnáním se světlem excitačním. Tento posun k nižším energiím a tím k vyšším vlnovým délkám je obecným Kashovým pravidlem<sup>2</sup> a posun mezi elektronově ekvivalentními přechody  $S_0^0 \rightarrow S_1^0$  pro excitaci a  $S_1^0 \rightarrow S_0^0$  pro emisi Stokesovým posunem. Na tomto posunu jsou založeny například technologie optických zjasňovacích prostředků, které absorbují v blízké UV a viditelné fialové oblasti (350-410 nm) a emitují světlo v modré části spektra (400-480 nm). Tedy k emisnímu spektru a distribuci polarizace přibyl obecně posun emisního spektra od excitačního (absorpčního)<sup>3</sup>.

<sup>2</sup> Jako klasická výjimka bývá uváděn izomer naftalenu **azulen**, který, na rozdíl od naftalenu, má poměrně vysoký dipólový moment, protože je ve skutečnosti tvořený tropyliovým kationtem a cyklopentadienylovým aniontem. V tomto případě pak i takto malá organická molekula emituje záření ve viditelném spektru s nenulovým kvantovým výtěžkem z hladiny  $S_2^0$ .

<sup>3</sup> Další výjimka z pravidel se týká důsledku Kashova zákona, který postuluje, že emisní spektrum je nezávislé na použité excitační vlnové délce. V jistých případech (polární molekula ve viskózním polárním prostředí) v důsledku časové shody relaxace okolí a doby života excitovaného stavu dochází k posunu maxima emise s posunem excitační vlnové délky – anglicky Red Edge Excitation Shift. Tento posun může být zajímavý z hlediska prokázání slabé interakce fluoroforu např. s polymery, nebo naopak nese informace o struktuře okolního prostředí.

### 3.1.2 Anisotropie

Pokud máme zdroj excitačního záření s definovanou rovinou polarizace, můžeme projekce rovin polarizace jednotlivých fotonů vztáhnout právě k této rovině a obdržet tak stejnojmennou charakteristiku „polarizace“ nebo při zahrnutí všech potenciálních rovin polarizace častěji používanou veličinu anisotropie. Pokud tedy stanovíme intenzitu fluorescence v rovině polarizace shodné s excitační rovinou  $I_{\parallel}$  a v rovině k ní kolmé  $I_{\perp}$ , můžeme polarizaci vyjádřit jako  $p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$  a anisotropii jako  $r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$ .

### 3.1.3 Doba života

Další velmi důležitou charakteristikou je střední doba, po kterou trvá záření, pokud excitační záření vyhasne. Jeden elektron se vrátí na základní hladinu v daném konkrétním čase, elektrony skupiny fluoroforů vykazují v čase návratu distribuční charakter, který popisuje adekvátně kinetika prvního řádu. Střední dobou trvání v tomto případě je doba, kdy počet excitovaných elektronů klesne na hodnotu  $1/2,71828\dots$  (reciproká hodnota Eulerova čísla). V takovém případě pak v daném čase je 67 % elektronů již v základním stavu a 33 % zůstává v excitovaném stavu. Charakteristický čas je tak rychlostní konstantou této reakce a je označován jako doba života excitovaného stavu. Pokud nehrají roli žádné nezářivé procesy, pak tato doba je označovaná jako zářivá (radiační) doba života. Nezářivé procesy, které reálnou dobu života excitovaného stavu ovlivní, jsou většinou výsledkem interakce reálného fluoroforu s reálným prostředím a stanovená doba života je tedy charakteristická pro danou kombinaci fluorofor–prostředí. Pokud srovnáme zářivou dobu fluorescence s dobou ovlivněnou všemi dalšími procesy excitovaného stavu, dostáváme efektivitu zářivého procesu, která se nazývá kvantový výtěžek ( $\Phi$ ).

### 3.1.4 Intenzita fluorescence

Nezanedbatelnou vlastností je samozřejmě i celkový počet fotonů v daném spektrálním rozmezí za jednotku času – intenzita fluorescence. Z definice intenzity fluorescence vyplývá omezení této charakteristiky<sup>4</sup> – je závislá na třech na sobě nezávislých veličinách: a) molárním extinkčním koeficientu; b) koncentraci; c) kvantovém výtěžku. Tyto tři veličiny mohou výrazně ovlivnit stanovenou hodnotu, a proto tato hodnota nemusí být spolehlivou charakteristikou ohledně informací vlastnosti okolí. Například při vybarvování buněk není reálně ovlivnitelný konečný počet molekul fluoroforu, který daná buňka absorbuje. Dále, při vysoké koncentraci fluoroforů může docházet interakcí v excitovaném stavu ke snižování kvantového výtěžku bez ovlivnění extinkčního koeficientu (pyren a jeho deriváty) nebo dojde k různým typům agregace, které mění jak extinkční koeficient, tak kvantový výtěžek (H a J typy agregace – akridinová

<sup>4</sup> Intenzita fluorescence  $F$  je definována vztahem  $F = k \cdot I_0 \cdot \Phi \cdot (1 - 10^{-\varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l})$ , kde  $k$  je přístrojová konstanta,  $I_0$  je intenzita dopadajícího záření,  $\Phi$  je kvantový výtěžek,  $\varepsilon_{\lambda}$  je molární extinkční koeficient,  $c$  je molární koncentrace fluoroforu/částice a  $l$  je optická dráha v centimetrech. Pokud je pohlceno méně než 2 % dopadajícího záření, rovnice přechází na tvar:  $F = k \cdot I_0 \cdot \Phi \cdot \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$ .



oranž, hemicyaninová barviva, atd.). Z toho plyne, že intenzita fluorescence, mimo přísně definované podmínky, není vhodnou fluorescenční charakteristikou a není vhodné ji tak například používat do rovnic vyjadřující Stern-Volmerovu kinetiku nebo Försterův rezonanční přenos energie.

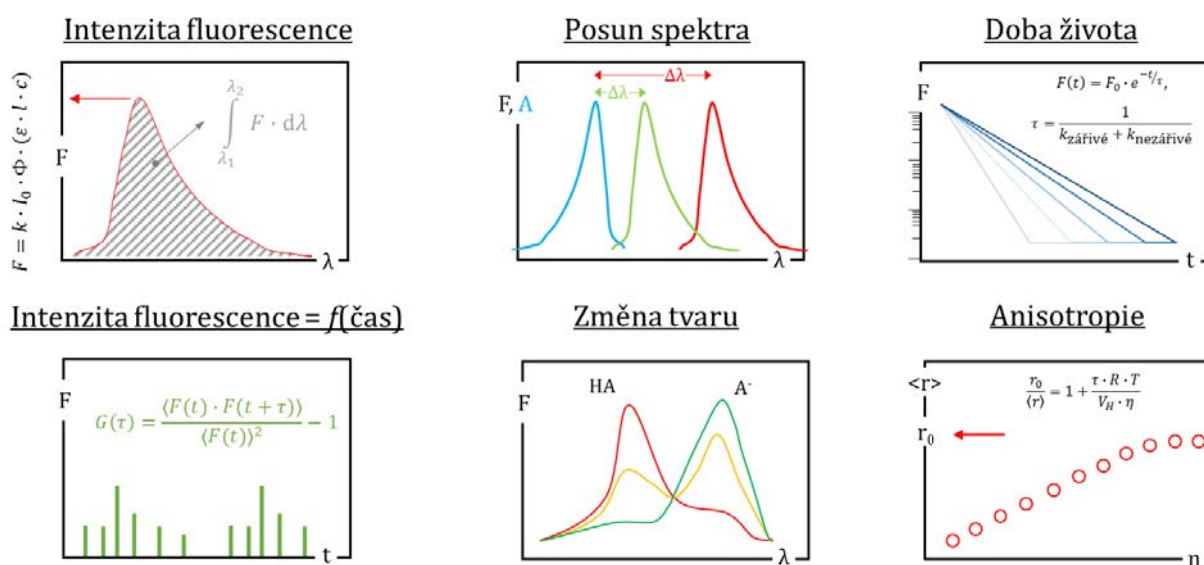
### 3.1.5 Fluktuační fluorescence

Další využití intenzity spočívá v zaznamenávání její časové změny. Pokud tato časová změna má periodický charakter, fluktuuje, můžeme pomocí vhodné matematické metody tuto periodicitu odhalit a přiřadit jí amplitudu a charakteristický čas. Tento čas může být dále interpretován podle zdroje fluktuací jako translační nebo rotační difúzní koeficient, rychlostní konstanta chemické reakce apod. Amplituda je přiřazena střednímu počtu částic v daném místě pozorování. Pokud intenzita fluorescence nefluktuje, ale klesá nebo stoupá, jedná se o další techniky, které se využívají na odhalení mobility jednotlivých fluoroforů nebo částic tyto fluorofory nesoucích.

Pro analýzu koloidních systémů jsou tedy k dispozici:

- tvar a pozice emisního spektra,
- doba života její distribuce pro různé vlnové délky,
- anisotropie – střední hodnota, rozložení během doby života, distribuce pro různé vlnové délky,
- intenzita fluorescence a její fluktuační.

Ke všem výše zmíněným charakteristikám lze přiřadit ještě prostorovou distribuci při použití např. konfokálního mikroskopu s možností skenování nebo jeho ekvivalentní varianty.



Obrázek 2 Přehled fluorescenčních charakteristik a jejich vybraných závislostí.

## 3.2 NÁVRH OBECNÉHO STUDIA AGREGAČNÍCH PROCESŮ

V rámci spolupráce s komerčními výrobci hydrofobně modifikovaných derivátů polymerů vznikla potřeba stanovit konečným počtem kroků, zda výsledný derivát splňuje kvalitativní vlastnosti požadované pro nosičový systém.

Níže uvedené schéma (Obrázek 3) ukazuje takovýto návrh. Sleduje cestu možných jednoduchých testů a navrhuje i další možnosti využití derivátů, které nesplní očekávané hodnoty. Schéma není vyčerpávající z hlediska finalizace nosičového systému, nicméně může tvořit dobrý základ jako první série testů a pomoci tak v první fázi vyřadit nevhodné nebo neagregující systémy.

Základní testování spočívá ve využití tří typově odlišných fluorescenčních sond. Perylen je velmi omezeně rozpustný ve vodě ( $1,58 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ )<sup>5</sup> a preferuje nejpolarnější části agregátů (logaritická hodnota rozdělovacího koeficientu  $\log K_{ow} = 6,30$ )<sup>6</sup>. Pyren je nejpoužívanější sonda pro studium průběhu agregace díky citlivější reakci na změnu polarity, což mu právě umožňuje jeho vyšší rozpustnost ve vodě ( $6,68 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ )<sup>7</sup> a nižší rozdělovací koeficient olej/voda ( $\log K_{ow} = 4,88$ )<sup>8</sup>. 1-anilinaftalen-8-sulfonát amonný (ANSA) je nejrozpuštěnější z uvažovaných sond (dle produktového listu dodavatele  $0,16 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>9</sup>, nicméně i tato vykazuje fluorescenci pouze po navázání do hydrofobních domén bílkovin, micelární palisádové vrstvy apod.

Úvaha je následující: pokud daný systém rozpustný ve vodě je schopný solubilizovat perylen, znamená to, že i přes hydrofilní charakter obsahuje velmi nepolární jádro. Pomocí pyrenu je pak možno popsat agregační proces daného systému a rozhodnout, jestli systém agreguje v rámci jedné molekuly (roubované kopolymery formující polymerní micely jako intramolekulární agregáty), nebo je to vícemolekulový proces (intermolekulární agregáty amfifilních látek nebo blokových kopolymerů).

V případě intramolekulárních agregátů odpadá potíže se zředěním daného systému. Velké bioaktivní molekuly nemají většinou jednotný charakter polární/nepolární, ale obsahují často skupiny nebo oblasti s různou afinitou k prostředí. Takovéto molekuly se pak mohou částečně solubilizovat, částečně adsorbovat na nosič. V tomto případě je taková látka vystavena prostředí, které může ovlivnit její funkci nebo může být uvolněna na nevhodném místě, případně adsorbována nepolárními doménami přítomných supramolekulárních agregátů. U tohoto typu agregátů je pak potřeba

---

<sup>5</sup> Yalkowsky, S.H., He, Yan, Jain, P. *Handbook of Aqueous Solubility Data* Second Edition. CRC Press, Boca Raton, FL 2010, p. 1216

<sup>6</sup> Andersson, J.T., Schrader, W. *Anal Chem* 71 (1999), 3610-3614

<sup>7</sup> Miller, M.M. et al. *Environ Sci Technol* 19 (1985) 522-529

<sup>8</sup> Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D. *American Chemical Society*. (1995), 137

<sup>9</sup>[https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/a3125pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a3125pis.pdf) (2.5.2018)

solubilizačními nebo lokalizačními testy prokázat rozměr a kvalitu hydrofobní domény a lokalizaci aktivní látky.

Intermolekulární agregáty jsou tvořeny obvykle desítkami až stovkami nízkomolekulárních amfifilních látek případně jednotkami až desítkami molekul blokových kopolymerů (di-blok, tri-blok). Takovéto systémy jsou dle velikostí svých monomerů a předpokládanému typu agregátů – micely nebo vezikuly – predikovatelné co do solubilizačních schopností vůči různě velkým solubilizátům. U těchto látek nastává problém s jejich praktickým použitím, kdy se např. při intravenózním podání naředí daná směs až 1 000krát. V tomto případě je vhodné volit pro tyto aplikace agregáty na bázi liposomů, které se po formování při ředění nerozpadají. Dalším pomocným měřítkem bude hydrofilně-lipofilní rovnováha (hydrophilic-lipophilic balance), která například pomocí sumy příspěvků jednotlivých skupin pomůže určit afinitu amifilní látky k polárnímu nebo nepolárnímu prostředí.

Varianta, kdy ze systému svítí jen ANSA, znamená, že hydrofobní domény jsou malé a pouze na povrchu, respektive že jsou dostupné právě jen ty na povrchu. V tomto případě, pokud má systém nějakou přidanou hodnotu, je přípravu potřeba rozšířit o fyzikálně-chemické postupy zahrnující například dialýzu z roztoku látek ve směsi rozpouštědel vhodných pro obě složky oproti vodě, lyofilizaci roztoku látek ze směsi rozpouštědel apod. Případné solubilizáty ve formě fluorescenčních sond nebo aktivních látek je potřeba přidávat ve většině případů do výchozí směsi před např. dialýzou.

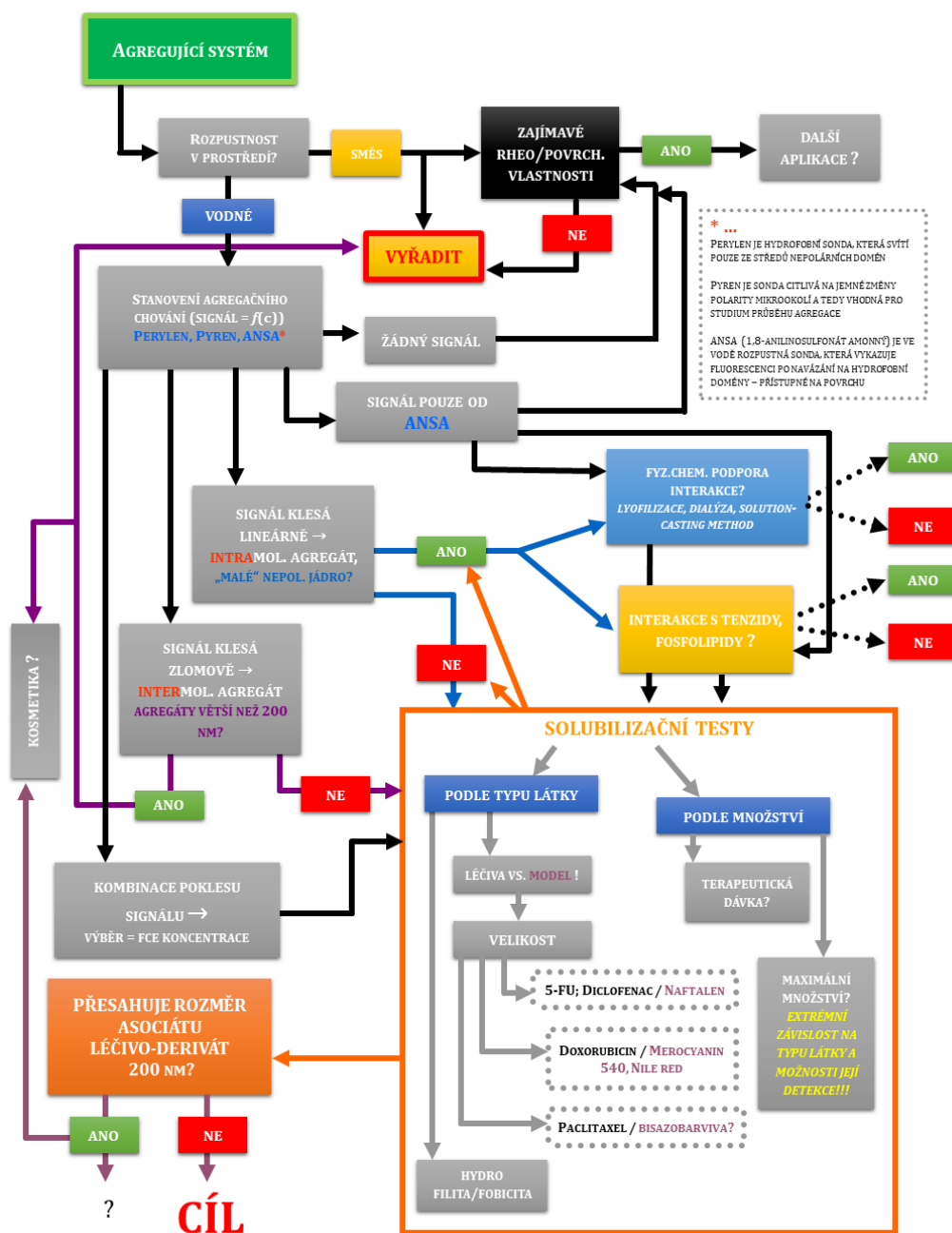
Posledním měřítkem bude rozměr samotného agregátu společně s charakterem jeho povrchu. V případě stanovení rozměru agregátu (hydrodynamického poloměru), lze s úspěchem využít metodu fluorescenční korelační spektroskopie, která je vhodná i pro studium stability nebo případné sorpce ostatních látek na systém v daném prostředí. Obecně se uvádí, že pro úspěšnou dlouhodobou cirkulaci v těle (EPR effect), je potřeba držet rozměry agregátu mezi 5 až 200 nm (někde uváděno užší rozmezí 10-100 nm)<sup>10</sup>, což jsou rozměry, se kterými ideálně pracuje metoda FCS<sup>11</sup>. Pro úplnost zmíněný charakter povrchu, ideálně bez sorpce bílkovin, hydrofilní.

Metoda fluorescenční sondy má jednu výhodu, která spočívá v tom, že netestuje „prázdné“ agregáty, ale podává přehled o těch, které obsahují fluorescenční sondu. Měření vlastností takovýchto agregátů je základ pro solubilizační testování případných nosičových systémů. Lze tedy říci, že pokud se nepodaří „vybarvit“ agregát fluorescenční sondou, pak pravděpodobně nebude možné tento systém „naplnit“ aktivní látkou stejného charakteru. Existují aktivní látky, které fluoreskují (vitamíny A, E, B<sub>2</sub>; cytostatikum doxorubicin apod.) a lze je použít pro výzkum i kvantifikaci solubilizace danými systémy.

---

<sup>10</sup> Petros, R.A., DeSimone, J.M. *Nat Rev Drug Discov* 9 (2010), 615-627

<sup>11</sup> Velmi cenné review **Koynov, K., Butt, H.-J., Curr Opin Colloid In 17 (2012) 377-387**



Obrázek 3 Workflow schéma využití fluorescenční spektroskopie pro studium agregujících systémů s uvažovaným využitím v nosičových systémech.

Pokud tedy se systém ukáže jako vhodný pro přenos dané látky a výsledný komplex opět bude v přijatelném rozsahu velikostí, může následovat pokročilejší testování systémů, které mohou být založeny na pokročilejších fluorescenčních technikách.

Jako první můžeme uvést lokalizaci dané látky nebo fluoreskujícího analogu v rámci agregátu pomocí místně selektivních zřášečů fluorescence. Neúčinnějším zřášečem je atom jódu, který může být použitý jako součást organického nebo anorganického komplexu. Pro exponované fluorofory umístěné ve vnějších vrstvách agregátů je účinným zřášečem anion iodu, nejčastěji ve formě KI. Hluběji zanořené fluorofory, které se

pohybují v palisádové vrstvě, se používá 3-iodpropanová kyselina nebo cetyltrimethylamonium chlorid. Fluoreskující látky zanořené do hydrofobního jádra zháší fenyliodid<sup>12</sup>.

Druhou technikou, kterou lze úspěšně využít, je fluorescenční korelační spektroskopie, využitelná pro stanovení nízkých koncentrací látek a je tak použitelná ve studiu uvolňování aktivních látek. Z měření zároveň vyplývá, jestli fluoreskující látka je rozpuštěná v molekulární formě, nebo je součástí většího agregátu – tyto informace poskytuje difúzní koeficient.

### 3.3 OMEZENÍ, PROBLÉMY... A JEJICH MOŽNÉ ŘEŠENÍ

Technika fluorescenční spektroskopie bude citlivá na podobné problémy jako jakákoliv spektroskopie využívající spektrální oblast 200 až 800 nm, respektive až 1 500 nm. Problémy se mohou týkat jak samotné instrumentace, tak i charakteru vzorku. Opomenutí těchto omezení pak vede ke špatné interpretaci naměřených dat.

#### 3.3.1 *Excitace a detekce*

Standardní spektrofluorimetry nebo luminiscenční spektrometry mají rozsah excitačních vlnových délek daný rozsahem excitačního zdroje, kterým bývá nejčastěji xenonová výbojka. Tyto výbojky jsou pro praktické použití vybaveny vrstvou, která absorbuje vlnové délky do cca 250 nm z důvodu omezení tvorby ozonu, nicméně toto zmenšuje dostupný excitační rozsah. Kromě zdrojů s více či méně kontinuálním spektrem emitovaných vlnových délek lze použít ještě diskretní laserové zdroje, které mají velmi úzkou distribuci vlnových délek a je tak omezena jejich univerzálnost. V současnosti jsou na trhu dostupné takzvané „bílé lasery“ nebo „superkontinuální lasery“, které kombinací krystalů nebo laserových barviv pokrývají aktuálně spektrální rozsah 400-900 nm, což opět není příliš praktické z důvodu chybějících vlnových délek pod 400 nm. Z hlediska koloidních systémů je výhodné mít co nejširší excitační možnosti, především z hlediska rozptylu excitačního paprsku, který bývá často přítomný v koloidních systémech.

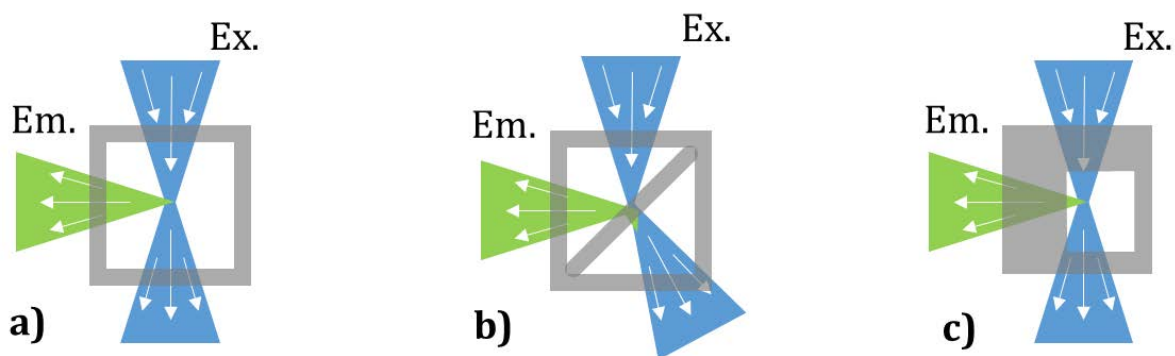
#### 3.3.2 *Kompenzace rozptylu a vysoké koncentrace fluoroforů*

Rozptyl (Rayleighův) je nepřímo úměrný čtvrté mocnině vlnové délky a je tedy výhodnější použít vlnovou délku 800 nm spíše než 400 nm. Nutnou podmínkou ovšem je získat shodné informace při použití různé vlnové délky. To lze řešit použitím sond s výrazně posunutou absorpcí k blízké infračervené části, které mají obdobnou reakci na studovanou veličinu. V tomto případě je ale nutné mít i příslušný detektor, citlivý na příslušnou oblast, což v současnosti není jednoduché.

---

<sup>12</sup> Deumié, M., El Baraka, M., Quinones, E. *J Photoch Photobio A* 87 (1995), 105-113

Pokud není možné změnit fluorofor, je potřeba co nejvíce potlačit rozptyl světla v takovýchto systémech. V tomto případě se rozptyl týká i emitovaných vlnových délek, protože o ty jde především. V zásadě lze použít tři různé přístupy: 1) změnit trajektorii excitace a emise; 2) použít polarizátory a 3) kompenzovat spektrální prostupnost pro různé vlnové délky pomocí absorpční spektrofotometrie - potlačení vnitřních filtračních efektů I. a II. druhu.



Obrázek 4 Různé způsoby excitace za použití speciálních kyvet. Obrázek schematicky ukazuje, jak lze za použití speciálních kyvet dosáhnout různých způsobů excitace. a) pravoúhlá excitace (RA); b) excitace povrchové vrstvy (FF); c) mimosředová excitace (OC).

- 1) Změna trajektorie souvisí s různým úhlem mezi excitačním emisním paprskem. Ve většině případů „klasických“ stolních spektrofluorimetrů se užívá pravoúhlé uspořádání, které bývá nazýváno anglicky „right-angle“ (Obrázek 4). Dalšími možnostmi jak excitovat a posléze snímat jsou například tzv. „front-face“ (snímání z přední povrchové vrstvy) případně „off-center“ (mimosředová excitace). Tyto typy geometrií jsou využívány přednostně v případech, kdy jsou vzorky příliš koncentrované (z hlediska fluoroforu), zakalené nebo pevné. Ve většině případů se pro tato měření vyrábějí speciální kyvety, které jsou kompatibilní se standardním kyvetovým prostorem.
- 2) Použití polarizátorů značně zeslabuje excitační a detekovaný proud fotonů, nicméně může pomoci, zvláště pokud je potřeba vykreslit spektrum látky s velmi malým Stokesovým posuvem v zakalené disperzi. Polarizátory se používají v kolmé konfiguraci (horizontálně umístěný emisní polarizátor odfiltruje většinu rozptýleného vertikálně polarizovaného excitačního záření, protože rozptýlené světlo udržuje původní směr polarizace) nebo je ponechán excitační polarizátor vertikálně a emisní je nastaven na hodnotu magického úhlu  $54,7^\circ$ . Toto samozřejmě neplatí vždy ideálně a podle typu materiálu (přítomnosti různých chirálních center) dochází různě ke stáčení roviny polarizace rozptýleného světla.
- 3) Poslední přístup je nejzásadnější a pro vykreslování spekter a následné používání intenzity fluorescence, ať jako integrál pod spektrem nebo při jedné vlnové délce, je absolutně nezbytný. Pomocí absorpčního spektrofotometru lze otestovat vzorek pro spektrální propustnost na všech excitačních i emisních vlnových délkách a pro

danou optickou dráhu (různá při různých geometriích). Standardně se vztahuje pozorovaná intenzita fluorescence na transmitanci při dané excitační a emisní vlnové délce. Prakticky se provádí měření v kyvetě s optickou dráhou 1 cm tak, aby absorpční spektrum zahrnuo všechny excitační a emisní vlnové délky. Obdržené hodnoty absorbance se vztáhnou k hodnotě optické dráhy a dostáváme univerzální veličinu optická hustota (optical density, OD), která vyjadřuje zeslabení vzorku absorpcí a rozptylem. Tato veličina se pak násobí danou optickou dráhou  $l$  pro excitaci a emisi (v pravouhlé konfiguraci obě 0,5 cm) a její negativní hodnota jako mocnina čísla deset pak putuje do jmenovatele pro korekci pozorované intenzity fluorescence. Korekční vztah pak je:

$$F_{korigovaná} = F_{pozorovaná} \cdot 10^{l_{ex} \cdot OD_{ex}} \cdot 10^{l_{em} \cdot OD_{em}}$$

### 3.3.3 Příprava vzorků pro spektroskopii

Většina koloidních systémů nevykazuje fluorescenci sama o sobě, tzv. autofluorescenci, ale je potřeba je fluorescenčně vybarvit. Fluorescenční barvení je obecně dvou typů: a) metoda fluorescenční značky (angl. Fluorescence labeling); b) metoda fluorescenční sondy (angl. Fluorescence probing).

V prvním případě dochází k chemickému navázání fluoroforu na danou koloidní částici, což může samozřejmě změnit její chování v roztoku. Chemická vazba fluoroforu je tak přijatelná povětšinou pro velké a rigidní polymery (polysacharidy, bílkoviny). Nevýhody tohoto přístupu jsou již zmíněné ovlivnění vlastností koloidu a případná nestabilita vazby, protože fluorofor nemá většinou sám o sobě afinitu k místu, ke kterému je fyzikálně vázán. Z měření spekter, intenzity fluorescence nebo doby života nelze určit, jestli je měřen komplex koloid-značka nebo směs koloid + fluorofor. To lze odhalit pokročilejšími měřeními jako je fluorescenční korelační spektroskopie nebo anisotropie.

Metoda fluorescenční sondy přináší jiná úskalí. Jedno z největších je konkrétní lokalizace v heterogenních systémech, protože fluorofory se v tomto případě rozdělují v systému dle své afinity k danému prostředí. Rozdělování v mnoha případech podléhá rovnováze a je tedy obtížné najít jednu fluorescenční sondu jen na jednom místě.

Další problém může představovat vnášení fluorescenční sondy do systému. V předchozím oddíle jsme ukázali, že optimální koncentrace fluoroforu pro měření na klasickém spektrofluorimetru je řádově  $10^{-7}$  mol·L<sup>-1</sup>. Minimální objem vzorku pro měření ve standardní kyvetě s optickou dráhou 1 cm je 3 mL resp. naplnění kyvety o základně 1 x 1 cm do výšky 3 cm. Pokud tedy zvolíme základní objem vzorku třeba 5 mL, je celkové látkové množství fluoroforu ve vzorku  $5 \cdot 10^{-10}$  mol. Při střední molekulové hmotnosti 500 g·mol<sup>-1</sup> je pak celková navážka pro jeden vzorek  $2,5 \cdot 10^{-7}$  g, což je mimo možnosti přímého vážení. Toto se řeší dvěma různými způsoby s ohledem na rozpustnost sondy ve vodě:

- a) Fluorofory rozpustné ve vodě je možno připravit ve formě o tři řády koncentrovanějšího zásobního roztoku, než je požadovaná finální koncentrace. V případě vzorku o konečném objemu 5 mL je možné k danému systému přidat například 5  $\mu$ L zásobního roztoku a započítat ředění, nebo ředění zanést již do přípravy daného systému.
- b) Elegantnější varianta je využívána u vzorků nerozpustných ve vodě. Obdobně se připraví o tři řády koncentrovanější roztok fluoroforu v těkavém rozpouštědle – ideálně acetonu, případně chloroformu nebo methanolu. Do prázdné vialky se napipetuje příslušné množství zásobního roztoku a rozpouštědlo se nechá vytékat. Příprava vzorků pro mikroskopii

Příprava mikroskopických vzorků je velmi rozmanitá a záleží na druhu vzorku a požadované analýze – jiné podmínky budou platit pro měření fluktuace fluorescence v koloidech jiné pro mapování pH v živých buňkách. Popsat komplexní přípravu mikroskopických vzorků překračuje rámec této práce, nicméně některé specifické metody fixace a přípravy vzorků budou popsány v kapitolách s konkrétními praktickými příklady.

Pokud se zaměříme pouze na vybarvování vzorků, pak máme před sebou tři možné situace: 1) vzorek je fluorescentní; 2) vzorek je nefluorescentní; 3) vzorek nevykazuje požadovanou fluorescenci, a navíc je živý.

V prvním případě je problém, pokud je vzorek „dobrým“ (vysoká absorpce, vysoký kvantový výtěžek) fluoroforem nebo fluorescentní částicí. Pro měření parametrů pomocí fluorescenční korelační spektroskopie platí omezení počtu částic v pozorovaném objemu. Pokud je tedy studována koncentrační závislost, musí se rozmezí držet v daném, v absolutních hodnotách nízkém, koncentračním rozsahu.

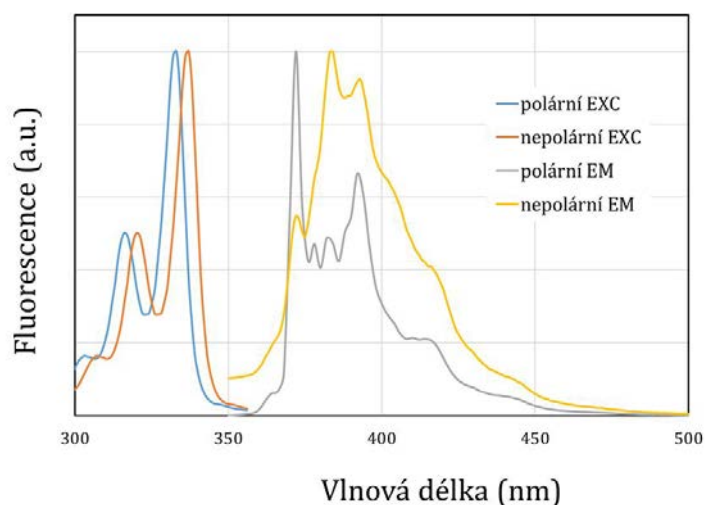
Pokud pracujeme s nefluorescentním vzorkem, pak postup vybarvení bude záviset na charakteru vzorku a příslušné formy fluoroforu. Pro aplikace využívající fluktuaci intenzity je opět nutné držet koncentraci fluoroforu v nanomolární koncentraci. Vzorky o definované koncentraci se velmi obtížně připravují a finální vzorek není takřka možné zkontrolovat jiným analytickým postupem. Jako neoptimálnější se jeví postup, kdy pomocí známého extinkčního koeficientu nebo připravené kalibrační závislosti stanovíme koncentraci vzorku s absorbancí v rozmezí 0,1-0,5.

Třetí varianta je nejkomplicovanější a paradoxně zároveň nejjednodušší. Jednoduchost spočívá v existenci spousty předpřipravených postupů a kitů, které celou věc značně ulehčují. Živé buňky je potřeba s barvivem a pomocnými látkami kultivovat v optimálním prostředí, které umožní průnik látky přes membrány.



### 3.4 PYREN JAKO FLUORESCENČNÍ SONDA

Využití pyrenu jako fluorescenční sondy je spojeno s jeho vcelku unikátní reakcí na polaritu svého mikrookolí. Obecně se dá říci, že intenzita prvního vibračního přechodu ( $S_1^0 \rightarrow S_0^0$ , lokalizovaného okolo 373 nm) a společně s ním i druhý ( $S_1^0 \rightarrow S_0^1$ , lokalizovaný okolo 378 nm) zvyšují svou hodnotu při přechodu z nepolárního do polárního prostředí. Ostatní přechody jsou ovlivněny pouze minimálně, a tak třetí vibrační přechod ( $S_1^0 \rightarrow S_0^2$ , lokalizovaný okolo 383 nm) je používán jako referenční. Poměr intenzit těchto přechodů  $I_1/I_3$  (Py 1:3 apod.) je pak úměrný polaritě daného mikrookolí. Tento poměr bude nadále označován v práci jako emisní polaritní index se zkratkou EmPI.



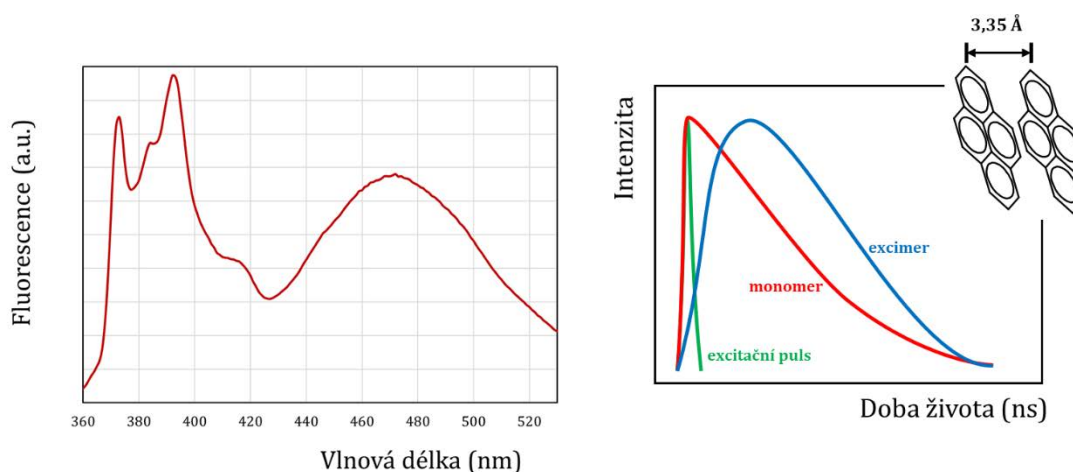
Obrázek 5 Excitační a emisní spektra pyrenu v polárním a nepolárním prostředí.

Dalším používaným parametrem je tzv. excitační polaritní index, označováný jako v literatuře jako  $I_{333}:I_{338}$  nebo  $I_{338}:I_{333}$ , dále označováný jako ExPI. Tento poměr vychází z rozdílné absorpce pyrenu v polárním ( $\sim 333$  nm) a nepolárním ( $\sim 338$  nm) prostředí. Tento pás patří přechodu označovanému jako La ( $S_0 \rightarrow S_2$ )<sup>13</sup>. Protože není vždy jednoduché přesně určit pozici maxima absorpce, využívá se faktu, že pík přechodu nemění při změně polarity svůj tvar (při zachování stejné šířky štěrby), ale jen se hypsochromně/bathochromně posunuje. V tomto případě je rozsah ExPI širší než u EmPI. Skutečnou hodnotu poměru můžou ovlivnit všechny efekty rozšiřující obecně spektrální pásy.

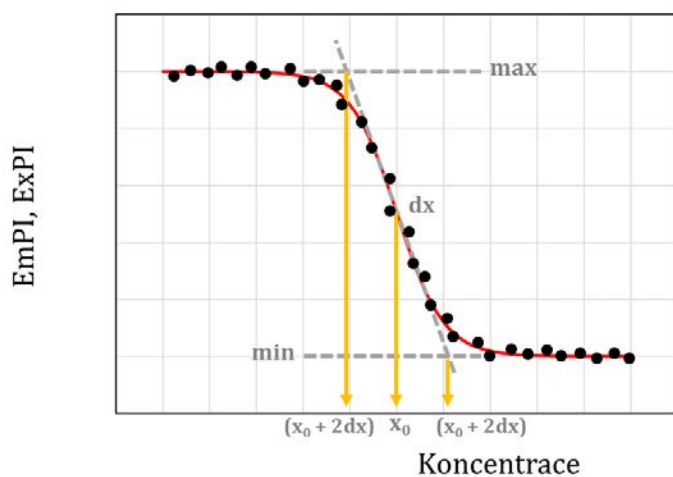
Třetím parametrem, pocházejícím z emisního spektra, je zastoupení excimeru. Excimer je tvořený sandwichovou strukturou skládající se z excitované molekuly a molekuly v základním stavu. Vzdálenost mezi molekulami je 3,53 Å [1]. Proces formování je bimolekulový proces, který je závislý na koncentraci a difúzním koeficientu. Tento proces zhasí monomerní emisi a sám emituje záření, které je posunuté k nižším energiím (maximum 450-470 nm) a je posunutý i v čase.

<sup>13</sup> Wilhelm, M. et al. *Macromolecules* 24 (1991), 1033-1040

Čtvrtým parametrem je intenzita fluorescence, která je ovšem ovlivněna extinkčním koeficientem, koncentrací a kvantovým výtěžkem. Spojeným parametrem je doba života, která je ovšem v případě pyrenu extrémně dlouhá ve stovkách nanosekund<sup>14</sup>. To umožňuje využití časového rozlišení od dalších fluoroforů, nicméně její délka je zároveň komplikací, protože typické doby života jsou v jednotkách nanosekund. Je ještě důležité zmínit, že pokud v oblastech tvorby excimeru je potřeba zúžit (vhodným emisním filtrem, monochromátorem a šířkou štěrbinou) oblast detekce mimo emisi excimeru. Vzhledem k tomu, že je časově posunutý vůči emisi monomeru, nebude vyhasínací křivka odpovídat váženému součtu jednotlivých exponenciálních křivek, ale projeví se jako proces, který je nutné odečíst a má zápornou hodnotu amplitudy.



Obrázek 6 Emisní spektrum monomeru a excimeru pyrenu (vlevo). Časový profil intenzity fluorescence po krátkém excitačním pulzu (zeleně) z pohledu monomeru (červeně) a excimeru (modrá).



$$\text{EmPI, ExPI} = \frac{\text{max} - \text{min}}{1 + e^{\frac{\text{koncentrace} - x_0}{dx}}}$$

Obrázek 7 Boltzmannova křivka jako model průběhu změny polaritních indexů na koncentraci agregujících systémů okolo kritické agregační koncentrace.

Všechny čtyři parametry lze využít ke studiu koloidních systémů a některé příklady jsou v následující kapitole. Vybrané aplikace. V použití pyrenu ve výzkumu asociativních

<sup>14</sup> Nakajima, A. *Bull Chem Soc Jpn* 46 (1973), 2602-2604

koloidů je potřeba zmínit důležitou publikaci skupiny z Málagy<sup>15</sup>. V roztoku roste koncentrace tenzidu přes hodnotu kritické micelární koncentrace za přítomnosti pyrenu a pozorované emisní parametry EmPI a ExPI vykazují typickou sigmoidní závislost, kterou popisuje Boltzmannova funkce (Obrázek 7). Tato čtyřparametrická funkce má tři charakteristické hodnoty – první zlom, poloha inflexního bodu a druhý zlom. V této práci byl porovnáním např. s vodivostním měřením navrhnout parametr poměru hodnoty  $x$ -ové souřadnice inflexního bodu a gradientu změny. Tento parametr pak ukazuje, jestli jako hodnotu kritické agregační (micelární) koncentrace využít inflexní bod nebo druhý zlom. Jestli je vyšší než hodnota „10“, je vhodné jako agregační koncentraci brát druhý zlom, pokud je nižší, tak inflexní bod.

## 4 VYBRANÉ APLIKACE FLUORESCENCE VE VÝZKUMU KOLOIDŮ

### 4.1 Nativní hyaluronan

Studium nativního hyaluronanu, sodné soli kyseliny hyaluronové, pomocí fluorescenční spektroskopie je velmi obtížné. Samotná kyselina hyaluronová nefluoreskuje a je ji tak třeba modifikovat. Chemická modifikace, navázání fluorescenční značky, pak může změnit charakter a interakční vlastnosti takto modifikovaného polymeru. Takto značené polymery jsou finančně nákladné nebo náročné z hlediska přípravy - především purifikace. Další variantou je použití fyzikálního afinitního značení, které v případě hyaluronanu zahrnuje nejvhodněji s karboxylovým aniontem D-glukuronové podjednotky.

Pro fyzikální interakci tak bude nejvhodnější použít malé fluoreskující kladně nabitě molekuly, jako je například akridinová oranž (AO). Hydrochlorid této fluorescenční sondy (AO+) nese kladný náboj, který se může vázat na karboxylové skupiny D-glukuronové podjednotky hyaluronanu. Akridinová oranž je zároveň typem barviva, které od koncentrace cca  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ve vodném prostředí tvoří v základním stavu komplexy, tzv. H-typ agregátů (sandwichový typ agregace)<sup>16</sup>. Tyto komplexy, dimery a oligomery, jsou spojeny přenosem elektronu a vznikem excitonu (Obrázek 8)<sup>17</sup>. Výsledkem zformování dimerů je hypsochromní posun absorpce (465 nm,  $\beta$ -pás)<sup>18</sup> oproti absorpci monomeru (492 nm,  $\alpha$ -pás), potlačení fluorescence monomeru a vznik bathochromně posunutého emisního pásu dimeru, který je kvantově mechanicky zakázaný, a proto velmi slabý<sup>19</sup>. Pokud je přítomné vhodné vazné místo pro molekulu AO+ (karboxylový aniont), je možno pozorovat formování agregátů už při řádově nižších koncentracích. Změnou koncentrace vazných míst nebo AO+ pak můžeme studovat interakci a rozložení

---

<sup>15</sup> Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolívar, J.A., Ruiz, C.C. *J Colloid Interface Sci* 258 (2003), 116-122

<sup>16</sup> dalším typem je J-typ agregace, označovaný jako „head-to-tail“

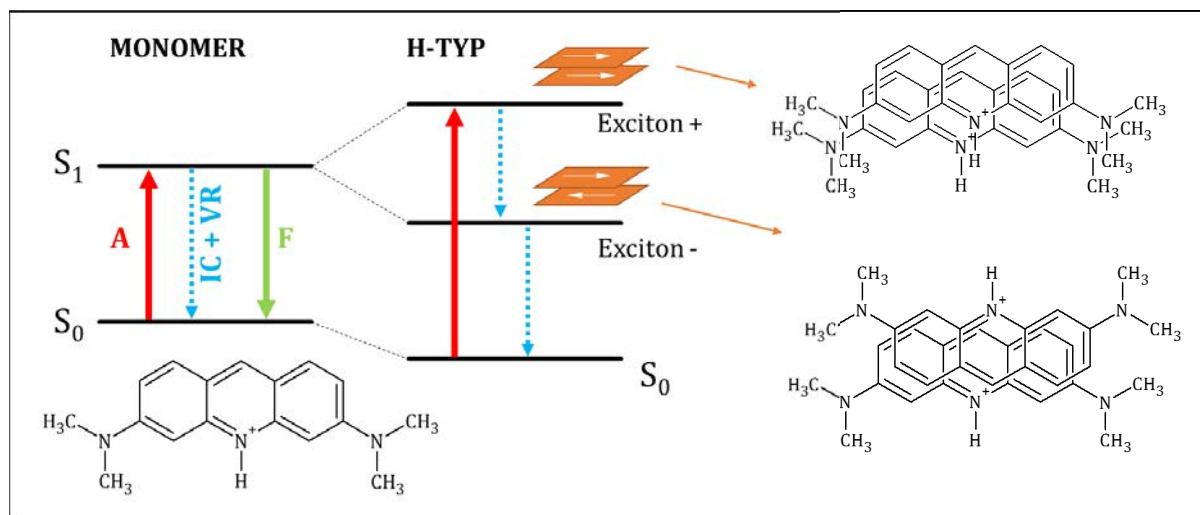
<sup>17</sup> dle Bayda, M. et al. *Dalton Trans* 46 (2016), 1914-1926

<sup>18</sup> oligomer absorbuje při 450 nm a je označován jako  $\gamma$ -pás

<sup>19</sup> např. Costantino, L. et al. *J Chem Eng Data* 29 (1984), 62-66

nebo Peyratout, C., Donath, E., Daehne, L. *J Photoch Photobio A* 142 (2001), 51-57

dostupných vazných míst polymeru pro interakci s molekulou AO+. Pokud chceme studovat změny ve větším rozsahu, může být překážkou koncentrace, kdy se tvoří dimery AO+ samostatně v roztoku. V případě hyaluronanu nás zajímají vyšší koncentrace, proto není vhodné postupné přidávání AO+, protože by nebylo možné rozhodnout, jestli je tvorba dimerů podmíněna přítomným volným vazným místem, nebo vysokou koncentrací AO+ v roztoku.



Obrázek 8 Zjednodušený Perrin-Jablonskiho diagram pro tvorbu excitonových pásů při H-typu agregace Akridinové oranže. Zkratka „A“ značí proces absorpce, „F“ fluorescenci a „IC + VR“ nezářivou deaktivaci procesem vnitřní konverze a vibrační relaxace.

Pro popis koncentračních změn je používán místo přímých hodnot koncentrace poměr počtu vazných míst a molekul AO+, který se označuje jako poměr P/D.

Pomocí agregující sondy AO+ byla studována pomocí intenzity fluorescence koncentrační řada nativního hyaluronanu a vliv iontové síly na interakci sonda-polymer při konstantní koncentraci AO+. Byly obdrženy atypické výsledky, které byly publikovány jako část rozsáhlejšího článku zahrnující i později intenzivně studované interakce hyaluronanu a kladně nabitého tenzidu<sup>20</sup>.

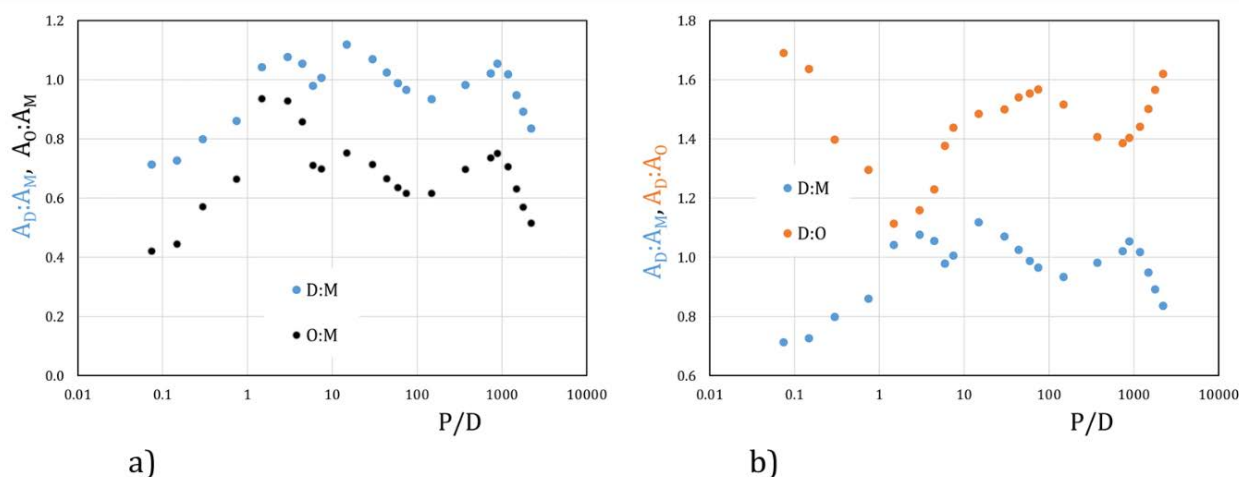
Za první atypický výsledek lze považovat, že minimum závislosti bylo nalezeno při hodnotě  $(P/D)_e = 3$ . Tato hodnota je 6x větší než teoretická hodnota bodu ekvivalence. To může mít několik důvodů. Jedno z vysvětlení by mohlo být, že ne všechny karboxylové skupiny jsou stericky dostupné a že tuto dostupnost ovlivňuje konformace polymeru v roztoku a samotná nenulová velikost iontu AO+. To by ovšem znamenalo, že pro interakci je dostupných necelých 17 % přítomných vazných míst. Pokud vezmeme v úvahu, že skutečná koncentrace v bodě ekvivalence je  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , potom víme, že se pohybuje ve velmi zředěném režimu a můžeme vyloučit intermolekulární interakce. Ze sekundární struktury hyaluronanu plyne, že každý další monomer je otočen vůči předchozímu o  $180^\circ$ . Pokud by tedy struktura řetězce v roztoku kopírovala povrch koule, který není proniknutelný pro AO+, byla by, v nejhorším možném případě orientace

<sup>20</sup> Mondek J., Mravec, F. et al *Langmuir* 30 (2014), 8726-8734

karboxylové skupiny kolmo ke kulové ploše, dostupná jen polovina karboxylových skupin. Další pokles by pak mohl být připisán sterickým faktorům. Alternativní vysvětlení by pak znamenalo, že vazná místa jsou stericky dostupná, ovšem nejsou ionizovaná. Toto alternativní vysvětlení ovšem stojí proti předpokladu, že hyaluronan je 100% sodnou solí kyseliny hyaluronové a faktu, že i zbývající karboxylové skupiny mají své  $pK_a^{21}$  mezi hodnotami 3-4, což při pH roztoku hyaluronanu 6-7 znamená plnou disociaci. Zde je na místě ovšem poznamenat, že i podle Specifikačních listů výrobců může pH nabývat kyselého charakteru, což by v případě soli slabé kyseliny a silné zásady nemělo být možné.

Dalším atypickým výsledkem je chování intenzity fluorescence a poměru  $A_D:A_M$  při zvyšující se koncentraci polymeru. V tomto případě za bodem ekvivalence nastává očekávaný nárůst intenzity fluorescence a pokles poměru absorbcí. U poměru absorbcí pak dochází ke dvojité změně trendu, kdy nárůst intenzity fluorescence je doprovázen nárůstem a následným poklesem poměru  $A_D:A_M$ . Toto chaotické chování poměru lze snad dát do souvislosti s faktem, že celkový nárůst fluorescence není prudký a jsou zde oblasti se silně se překrývajícími chybovými úsečkami.

Nejprekvapivější výsledek ovšem nastává při překročení hodnoty  $P/D = 100$ . V této oblasti, kdy má počet vazných míst o dva řády převyšovat počet molekul barviva dochází k opětovnému poklesu fluorescence spojené s nárůstem obsahu dimeru. Pokles dosahuje minima při hodnotě  $P/D = 1\ 000$ , což odpovídá koncentraci hyaluronanu cca  $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (!). V následující oblasti  $P/D$  od 1000 do 3000 pak následuje strmý nárůst intenzity fluorescence spolu s poklesem obsahu dimeru. Pro toto podivné chování připadá v úvahu teorie, která zahrnuje fakt, že při hodnotě  $P/D = 142$  je koncentrace hyaluronanu  $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , což znamená přechod ze zředěné do polozředěné oblasti<sup>22</sup>. V této fázi pak řetězce mohou



Obrázek 9 Srovnání nepublikovaných závislostí poměru absorpce oligomeru k monomeru (a, černá) a závislost absorpce dimeru k monomeru (b, oranžová). Doplněno o publikovanou závislost dimeru k monomeru (modrá).

<sup>21</sup> Mero, A., Campisi, M. *Polymers* 6 (2014), 346-369

<sup>22</sup> Polozředěná oblast, oblast kde dochází k propletení řetězců (chain entanglement), byla stanovena (Fouissac, E.; Milas, M.; Rinaudo, M. *Macromolecules* 26(1993), 6945-6951.) pomocí součinu koncentrace a relativní molární hmotnosti na hodnotu  $280\ 000\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . To znamená, že v rozsahu relativních molárních hmotností  $300\ 000$ - $1\ 400\ 000$  jsou přechodové koncentrace  $0,93$ - $0,2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

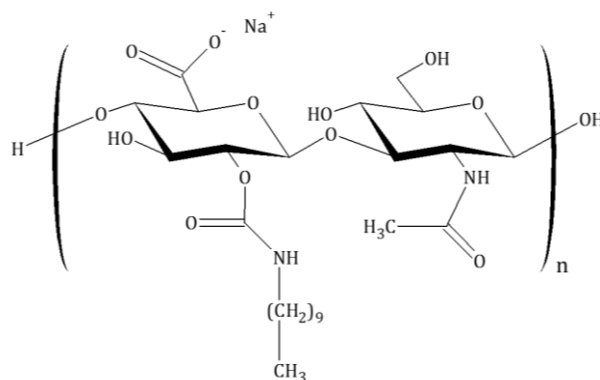
preferovat vzájemné interakce a tvořit vnitřní, pro AO+ nedosažitelné, domény. Zároveň může hrát roli i fakt, že nabitá AO+ bude zachytávána na povrchu takovýchto agregátů a nebude penetrovat do vnitřní části k volným vazným místům. Tato teorie ovšem dobře nevysvětluje náhlý nárůst fluorescence se zvyšující se koncentrací, pokud ovšem při koncentraci odpovídající  $P/D = 1\ 000$  nedojde k další změně systému, která by znamenala uvolnění domén pro snadnější penetraci AO+ a roztok hyaluronanu by tak nepřešel do „gelu podobné“ fáze.

**SHRNUTÍ:** Podrobnou analýzou absorpčních/excitačních spekter a emisních můžeme podpořit nebo vyvrátit domněnky o chování koloidních systémů. Na základě tohoto „třídění“ hypotéz pak zůstanou konkrétní otázky, ze kterých vyplývá, jaké instrumentální techniky použít k jejich zodpovězení.

## 4.2 Deriváty hyaluronanu

Studium derivátů hyaluronanu, mj. hlavního polymeru extracelulární matrix, bylo součástí obhájené disertační práce autora<sup>23</sup>. Na základě tohoto výzkumu pak byly sepsány tři publikační výstupy<sup>24, 25, 26</sup>, přičemž nejdůležitějším byl výstup v *Colloid and Polymer Science* [26], a poznatky byly prezentovány také v rámci různých konferenčních příspěvků.

Alkyl deriváty hyaluronanu<sup>27</sup> jsou roubovanými kopolymery hyaluronanu u kterých lze měnit typ alkylového řetězce, stupeň substituce a molekulovou hmotnost výchozího polymeru. U takového typu derivátu lze očekávat koncentračně závislé agregační chování, které může mít typově dva hlavní mechanismy a jeden přechodný. První mechanismus je založen na předpokladu, že daný modifikovaný polymer není schopen



Obrázek 10 Struktura hydrofobně modifikovaného hyaluronanu.

<sup>23</sup> **Mravec, F.** *Aggregation behavior of polysaccharides in aqueous solutions*. Brno, 2008. 119 s. Disertační práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, Ústavu fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí disertační práce doc. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

<sup>24</sup> **Mravec, F., Pekař, M.** *Chemické listy*, 99 (2005), 594-595

<sup>25</sup> **Mravec, F. et al.** *Chemické listy*, 2008, 102 (2008), 1096-1096

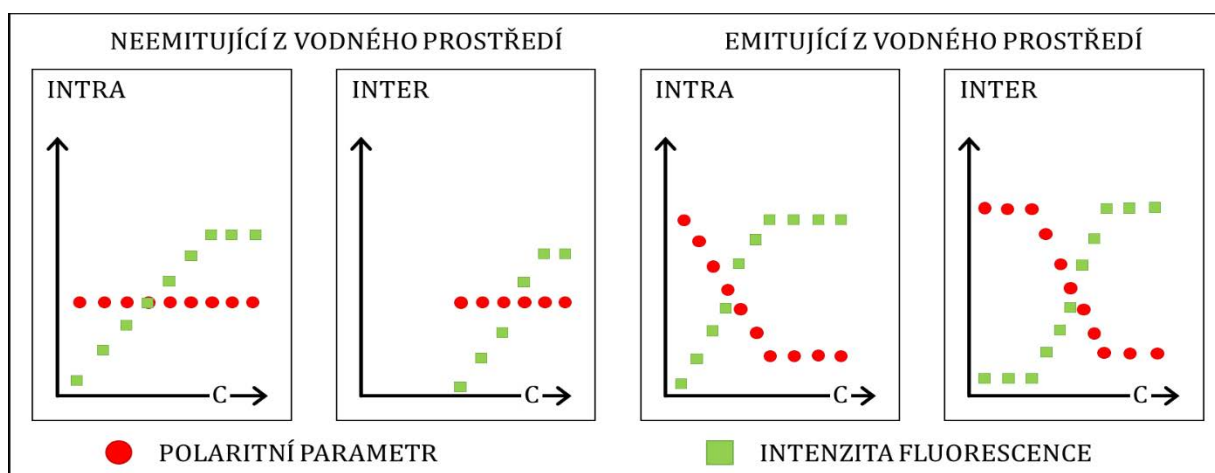
<sup>26</sup> **Mravec F., Pekař, M., Velebný, V.** *Colloid Polym Sci*, 286 (2008), 1681-1685

<sup>27</sup> Mlčochová P. et al. *Biopolymers* 82 (2006), 74-79

vytvořit intramolekulární agregát (např. kvůli nízkému stupni substituce nebo nedostatečné ohebnosti polysacharidové kostry) a bude tedy mít svou hodnotu agregační koncentrace. Druhý mechanismus je založen na vzniku intramolekulárních derivátů. Kombinovaný agregát si lze představit jako intramolekulární agregát, který od jisté koncentrace váže další řetězce tak, že nevytváří nové hydrofobní domény.

Vliv stupně substituce a výchozí molekulové hmotnosti na hodnotu agregační koncentrace popisuje publikace v *Colloid Polym Sci* [26] a podrobně se jí věnuje disertační práce [23]. Širší diskusi si zaslouží ovšem studium mechanismu agregace. Právě při rozvahách, jak popsat nejlépe daný systém pomocí fluorescenční spektroskopie, vzniklo schéma uvedené v kapitole 3.2 (Obrázek 3).

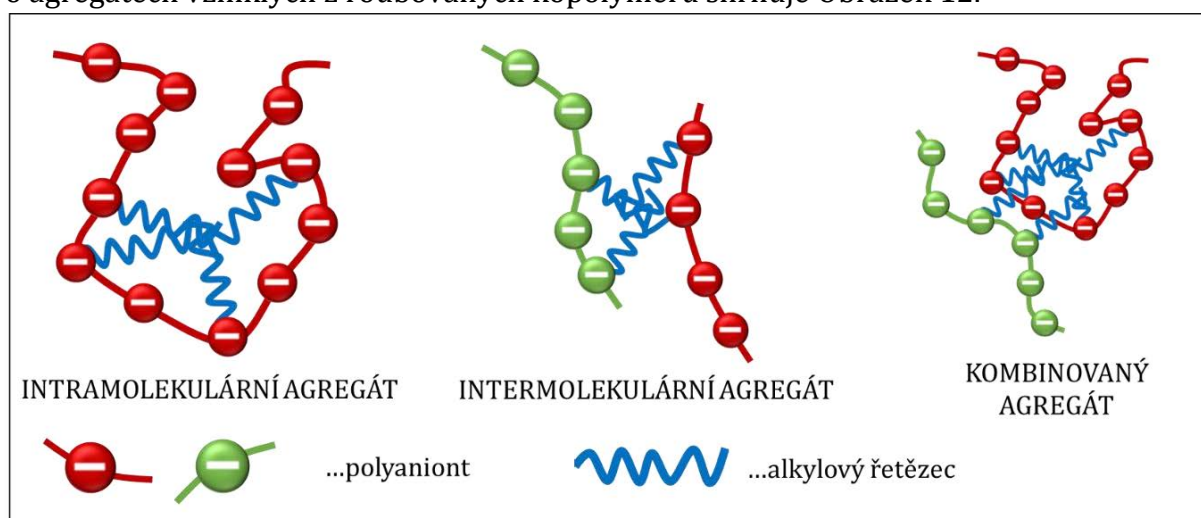
Základní myšlenka rozdělení intra- a intermolekulárních agregátů ve vodných roztocích spočívá ve sledování koncentrační změny vybraného parametru, například polaroty okolí sondy.



Obrázek 11 Schématické znázornění možných koncentračních závislostí fluorescenčních parametrů z vodných roztoků roubovaných kopolymerů.

Pokud budeme systém sledovat pomocí polaritní sondy, která ovšem nemá nulovou emisi z vodného prostředí (např. pyren nebo prodan), bude situace složitější. U intramolekulových agregátů bude postupně klesat hodnota polaritního parametru a růst intenzita do konstantní hodnoty. Závislosti parametru a intenzity fluorescence budou u intermolekulárních agregátů mít tvar klesající resp. u intenzity fluorescence rostoucí S-křivky. Je potřeba ovšem upozornit na významné odchylky u fluorescenčních sond, které tvoří excitované dimery, jako je právě pyren. Výše popsané jednodušší případy shrnuje graficky Obrázek 11.

Samostatnou diskuzi si zaslouží i přechodný typ agregátu, kdy ke vznikajícím agregátům např. intramolekulárním se od jisté koncentrace naváží další řetězce. Takovéto agregáty mají praktický dopad na využití nosičových systémů. Po navázání dalšího řetězce se zvětší agregát, ale není vytvořena nová hydrofobní doména. Toto lze prokázat například tak, že se ke studovaným fluorescenčním charakteristikám přidá i sledování fluktuace intenzity (fluorescenční korelační spektroskopie), ze které se přes stanovení difuzního koeficientu přidá informace o velikosti agregátu. V takovém případě bude sledovaná velikost s koncentrací narůstat, aniž by se měnila intenzita fluorescence – polarita hydrofobní domény se nebude měnit nebo bude jen velmi málo klesat v souvislosti se zapojením dalších hydrofobních řetězců do již vzniklé domény. Představu o agregátech vzniklých z roubovaných kopolymerů shrnuje Obrázek 12.



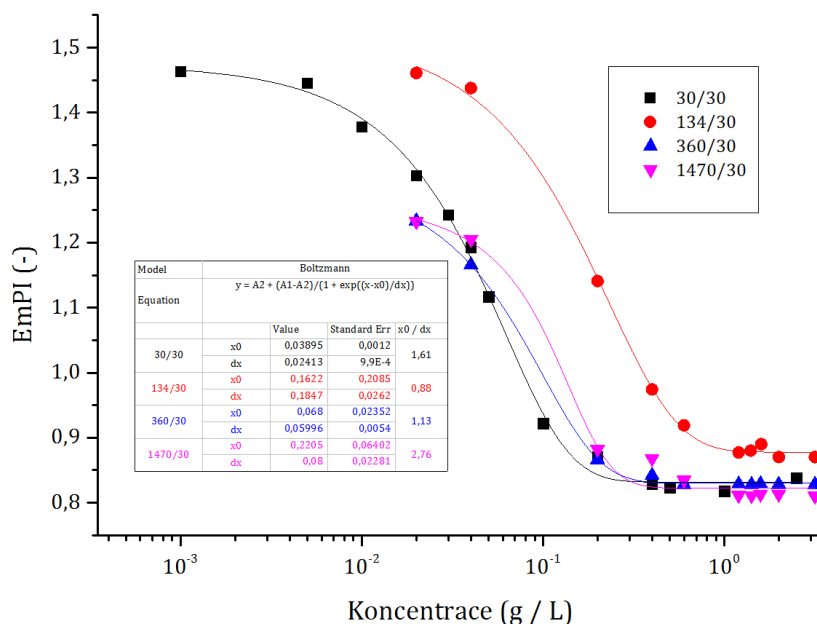
Obrázek 12 Schématické znázornění typů agregátů tvořených roubovaným polymerem

Z publikovaných dat vyplývá, že průběh závislostí pro daný typ agregátu odpovídá formování intermolekulárního agregátu. Závislosti emisních parametrů tvoří S-křivku, která znamená, že v jistém nízkém koncentračním rozmezí přidavek derivátu nevytváří hydrofobní domény schopné solubilizovat fluorescenční sondy. Polaritní parametry, jako je  $E_mPI$  od pyrenu nebo poloha maxima u Nilské červeně, zůstávají na hodnotách odpovídajících vodnému prostředí. Za povšimnutí stojí ovšem celkový průběh S-křivky. Při podrobnější analýze derivátu s nejnižší molekulovou hmotností  $30 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  a stupněm substituce 30 % je závislost výrazně komplikovanější, než nabízí model Boltzmannovy S-křivky. Pro stanovení agregační koncentrace, jako inflexního bodu závislosti, je potřeba využít fyzikálních limitací hodnot parametrů, kterých může dosáhnout daná fluorescenční sonda. Ty se pak zadají jako omezení (constraints) pro fitovací program. Obdržená hodnota je pak samozřejmě zatížena větší chybou z hlediska statistiky, nicméně menší chybou z hlediska skutečnosti. Je potřeba i uvážit, že derivát s tak nízkou molekulovou hmotností obsahuje jen cca 80 monomerních jednotek, které se mohou chovat rozdílně ve srovnání s takřka o dva řády většími molekulami.

Rozdíl v průběhu agregace lze alternativně popsat pomocí gradientu poklesu dalších sledovaných parametrů. Samotná hodnota gradientu, označovaná jako „ $\Delta x$ “ nebo „ $dx$ “, je



závislá na koncentračním rozsahu. Poměr inflexního bodu a gradientu, navržený v práci Aguiara [15], lépe reflektuje strmost změny polaritního indexu. Dle tabulky v obrázku pak můžeme porovnat strmost jednotlivých závislostí.



Obrázek 13 Reinterpretované závislosti dle [23] s vloženou analýzou poměru pozice inflexního bodu a gradientu závislosti. Popis v legendě je molekulová hmotnost v  $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ /stupeň substituce v %.

Obrázek 13 ukazuje vybraná data se shodným stupněm substituce, z vložených hodnot vyplývá, že poměr je nízký a nevykazuje významný trend v rámci změny molekulové hmotnosti. S ohledem na výše zmíněnou práci pak můžeme konstatovat, že agregace v tomto typu agregátů odpovídá agregaci ionogenních tenzidů, a tak tvorbě intermolekulárních agregátů.

**SHRNUTÍ:** Při současné úrovni znalostí a dostupností technik by bylo vhodné zvolit při studiu těchto systémů pokročilejší metody, jako je především fluorescenční korelační spektroskopie. Při zpracování disertační práce a publikací byla většina technik jen obtížně dostupná, proto byl hledán alternativní přístup ke studiu průběhu agregace.

### 4.3 Interakce polymerů a amfifilních molekul

Výzkum v této oblasti je více než vhodný pro studium pomocí fluorescenční spektroskopie. Obecně lze od interakce mezi polymerem a amfifilní látkou očekávat dřívější vznik hydrofobních domén a/nebo stabilizaci agregátů amfifilních molekul. Speciálním případem pak je tvorba fázově separovaných systémů, když přes destabilizaci koloidního roztoku dostáváme velmi stabilní hydrogelovou matici.

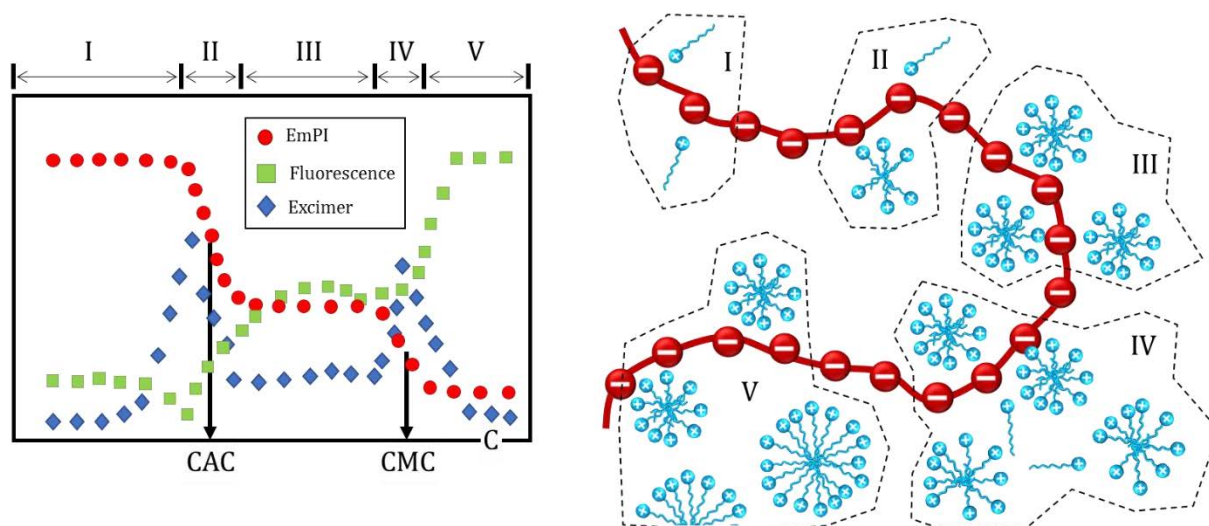
Studium interakce mezi polymery, specifitěji mezi polyelektrolyty a opačně nabitými tenzidy, probíhá v rámci Fakulty chemické VUT od roku 2008. Prvotní motivací pro studium těchto interakcí byla tvorba stabilizovaných koloidních částic, která by v sobě kombinovala výhody hydrofilních, biokompatibilních polyelektrolytů a zároveň

umožňovala solubilizaci nepolárním a amfifilním látkám. Takovéto systémy by byly formovány na základě fyzikálních sil, dominantně na základě nábojových interakcí. Fyzikálně vázané agregáty by pak také nebránily biodegradaci jednotlivých složek systému.

Nejčastěji se ve studiích objevuje biopolymer hyaluronan, u kterého je hlavním důvodem využití jeho biokompatibilita a zároveň biodegradabilita. Jak se podle získaných výsledků jeví, tak jeho největší slabinou je potřeba interakce se silně kladným tensidem, kvartérním amoniovým iontem. Souběžně se studiem struktury agregátů mezi hyaluronanem a amoniovými tensidy probíhaly i testy biokompatibility na vybraných buněčných kmenech na spolupracujícím pracovišti, které byly publikovány v zahraničních časopisech<sup>28,29</sup>. Součástí těchto výzkumů nebyla fluorescenční spektroskopie, pouze návrh a příprava komplexů, proto nebudou dále podrobně rozebírány.

#### 4.3.1 Interakce polyelektrolytů a opačně nabitých tensidů

Základním předpokladem je, že malé ionogenní amfifilní molekuly budou v přítomnosti opačně nabitého řetězce tvořit hydrofobní domény dříve než v roztoku bez polymeru za stejných termodynamických podmínek. Pokud sledujeme rostoucí koncentraci tensidu v přítomnosti polymeru ve vodném prostředí, můžeme na základě citlivosti metody sledovat vázání tensidu na polymer spojenou s indukci a po vysycení všech potenciálních vazných míst pak tvorbu volných agregátů v roztoku. Obecný vývoj z pohledu fluorescenční sondy pyren, emisní polaritní index s intenzitou fluorescence a



Obrázek 14 Model závislosti pyrenových parametrů emisního polaritního indexu (●), intenzity fluorescence (■) a zastoupení excimeru (◆) v případě konstantního obsahu polyaniontu hyaluronanu (—) a rostoucí koncentrace kationaktivního tensidu (—) ve vodném prostředí. Šipky označují začátek indukované agregace (kritickou agregační koncentraci, CAC) a při nasycení řetězce pak kritickou micelární agregaci (CMC). Protionty nejsou zobrazeny.

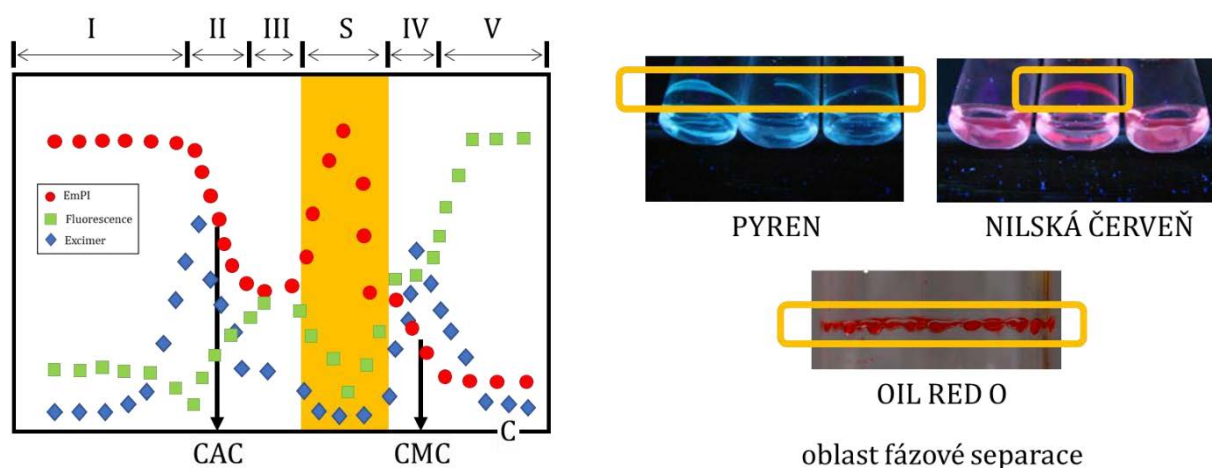
<sup>28</sup> Kalbáčová, M.; Verdánová, M.; Mravec, F.; Halasová, T.; Pekař, M. *Colloid Surface A* 460 (2014), 204-208

<sup>29</sup> Sauerová, P., Verdánová, M.; Pilgrová, T.; Venerová, T.; Mravec, F.; Kalbáčová, M.; Pekař, M. *Colloid Surface A* 483 (2015), 155-161

zastoupením excimeru, shrnuje Obrázek 14. Ve vývoji parametrů můžeme najít pět oblastí, označených římskými číslicemi I-V, a které jsou graficky prezentovány.

- **Oblast I** je typická pro z vody emitující fluorescenční sondu.
- **Oblast II** odpovídá poklesu polaritního indexu, buď na základě mixování signálu z polárních a nepolárních částí koloidního roztoku nebo na základě postupného formování indukovaných micel,
- **Oblast III** je nejkomplicovanější oblastí, protože zde může dojít k velkému množství jevů. Popsaná závislost předpokládá, že dalším přidavkem tenzidu budou obsazena další vazná místa polymeru, kde se budou indukovat micely.
- **Oblast IV** odpovídá formování přebytku tenzidu do volných micel v roztoku. Dochází k vázání zbylých molekul pyrenu a poklesu polaritního indexu, opět narůstá zastoupení excimeru.
- **Oblast V** je finální oblastí, přidavek tenzidu navyšuje počet micel, polaritní index se nemění, excimer se vytrácí a intenzita fluorescence by měla dosáhnout maximální hodnoty.

Navržené schéma však předpokládá jisté chování polymeru a tenzidu. U tenzidu se předpokládá, že tvoří sférické micely a nedochází u něho nad kritickou micelární koncentrací k fázovým přechodům v daném koncentračním rozsahu. U polymeru se předpokládá vysoká stabilita a hydrofilita. Podrobným studiem interakce mezi cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB) nebo carbethopendecinium bromidem (Septonex) a hyaluronanem se zabývá práce publikovaná v *International Journal of Biological Macromolecules*<sup>30</sup> a interakci ve vodném prostředí se zvýšenou iontovou silou společná publikace v *Colloid Surface A* z roku 2011<sup>31</sup>.



Obrázek 15 Grafická interpretace případu, kdy dochází k fázové separaci. Oblast označená písmenem „S“ koresponduje se žlutě označenou oblastí na fotce, kde lze vidět pod UV-lampou vzorky s pyrenem a Nilskou červení, u nichž došlo k fázové separaci a následné depozici gelové fáze na okraje vialek. Vzorky doplňuje shodná fotka s Olejovou červení.

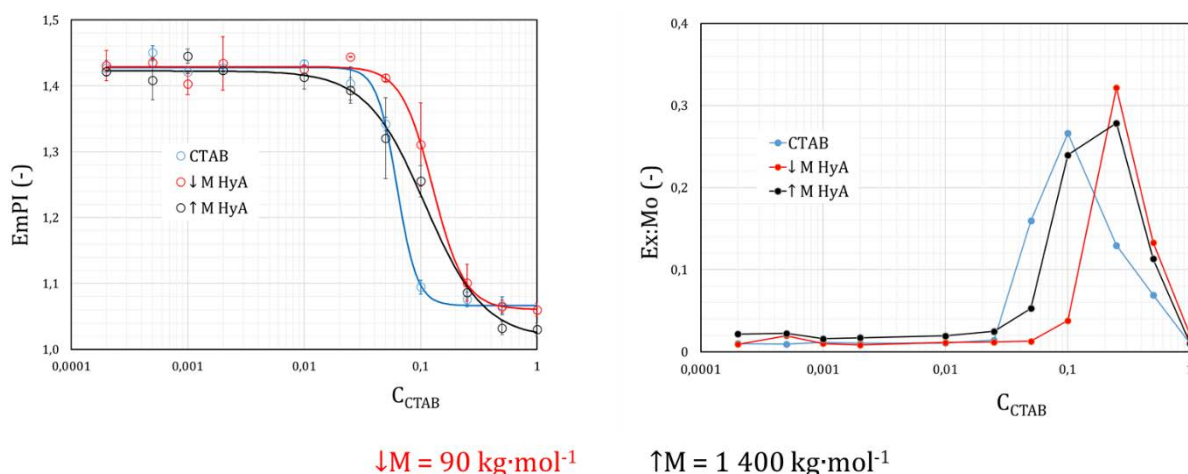
<sup>30</sup> Pilgrová, T., Venerová, T., **Mravec, F.**, Pekař, M. *International Int J Biol Macromol* 112(2018), 241-249

<sup>31</sup> Halasová, T., Krouská, J., **Mravec, F.**, Pekař, M. *Colloid Surface A* 391 (2011), 25-31

Na základě těchto dat pak je nutné upravit tento model pro konkrétní případ interakce ve vodných roztocích hyaluronanu a CTAB, jak shrnuje Obrázek 15. V tomto obrázku přibyla mezi oblastí III a IV oblast označená písmenem „S“, kde dochází k fázové separaci, tvorbě sraženiny, která přechází na gel. Tento gel lze pozorovat, pokud systém obsahuje hydrofobní barvivo. To samo o sobě je důkazem, že tento gel zachovává hydrofobní domény, které mohou solubilizovat nepolární látky. O zachování nepolárních domén svědčí i pozorovatelná emise Nilské červeně, která je ve vodném prostředí zhášena.

Metoda fluorescenční sondy je tedy velmi elegantní metodou studia interakce, zvláště pokud je k dispozici víceparametrový systém, jako pyren. V každém případě je měření vhodné doplnit i typem sondy, která neemituje z vodného prostředí a je tak schopna přinést informace ohledně formované hydrofobní domény.

Pokud upravíme iontovou sílu roztoku na fyziologickou hodnotu  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , vymizí dvojlomový průběh i průběh s fázovou separací, agregace odpovídá jednoduché Boltzmannově křivce a zlomová část je posunuta k nižším koncentracím (viz [31]). Jako zajímavý můžeme označit vliv přídavku hyaluronanu, který naopak posouvá agregační hodnoty k vyšším hodnotám (Obrázek 16). Pokud porovnáme parametr  $x_0/\Delta x$  pak pro CTAB dostáváme hodnotu 0,048, pro nízkomolekulární hyaluronan 0,095 a vysokomolekulární 0,060. Jak lze pozorovat, poměr v přítomnosti hyaluronanu se zvýšil, nicméně zůstává velmi nízký, a tak jako agregační koncentrace je brán inflexní bod proložené závislosti. Posun agregační koncentrace dobře ilustruje i závislost obsahu excimeru.



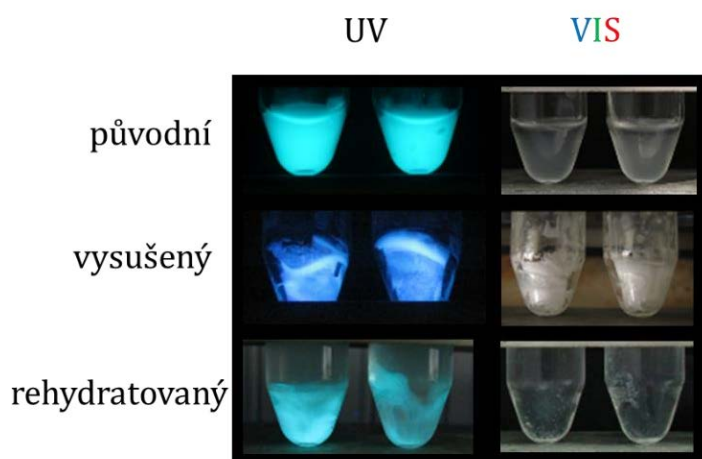
Obrázek 16 Závislost emisního polaritního indexu (adaptováno z [31]) a poměru excimer:monomer (nepublikovaná data) na koncentraci kationaktivního tenzidu ve vodě v přítomnosti hyaluronanu o koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a iontové síle  $0,15 \text{ M}$  upravené NaCl.

#### 4.3.2 Fázová separace v systému polymer-tenzid za vysokých koncentrací

Z předchozí kapitoly vyplynulo, že při specifické kombinaci podmínek dochází u systémů k fázové separaci a tvorbě hydrogelové fáze. Toto by se dalo využít ke tvorbě nové třídy hydrogelů, protože, jak je patrné z fotek (Obrázek 15), jsou i v prostředí hydrogelu zachované nepolární domény.

Pro praktické využití je ovšem tvorbu hydrogelu potřeba výrazně navýšit. Z praxe plyne, že toto nelze udělat ve vodném roztoku, protože opačně nabitě tenzidy vytváří s hyaluronanem sraženinu v procesu purifikace a izolace opačně nabitých polymerů. Jak bylo zjištěno, pokud je v systému přítomné zvýšené množství nízkomolekulárního elektrolytu, přechází systém ve vysokých koncentracích na hydrogel, obdobně jako v nízkých koncentracích bez zvýšené iontové síly.

Vzniklý systém obsahuje jak vodnou fázi, tak i fázi micelární, která se může od standardní micely lišit. Díky této struktuře mohou být v gelu inkorporovány jak hydrofilní, tak hydrofobní složky, případně i supramolekulární částice, které budou zadrženy stericky.



gel: 2 % hm.  $650 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  + 100 a 200 mM CTAB

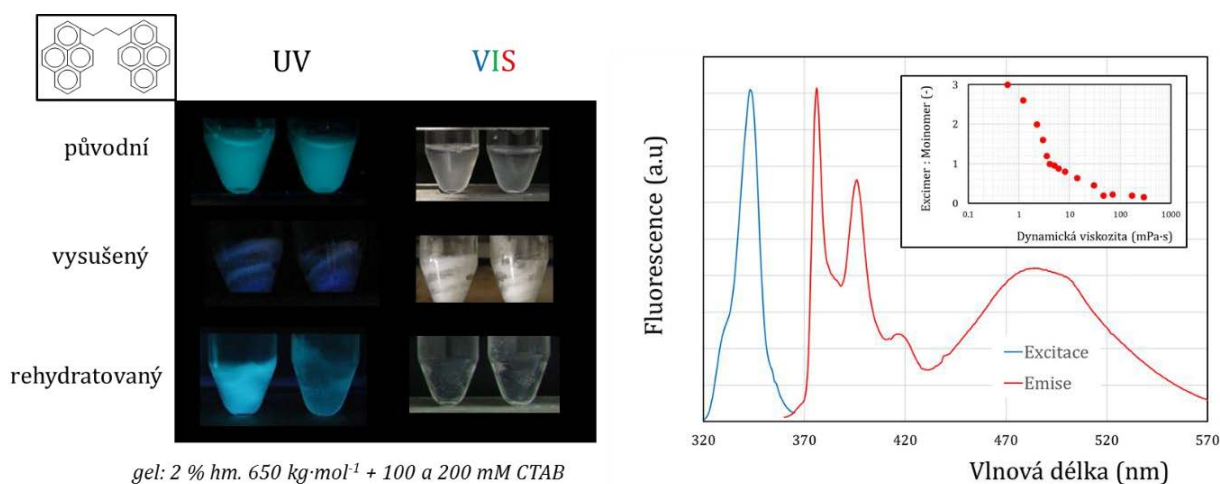
Obrázek 17 Vizualizace vysychání a rehydratace hydrogelu pomocí sondy prodan.

Pokud do hydrogelu inkorporujeme vhodnou sondu, můžeme pozorovat například jeho přechod na xerogelovou formu. Vhodnou fluorescenční sondou je prodan, vykazující modrou emisi v nepolárním prostředí a zelenou emisi v prostředí vodném. Ve fázově separovaném hydrogelu pak díky přítomnosti polárních i nepolárních domén vykazuje smíšenou emisi, která se jeví při pozorování jako tyrkysová. Při postupném sušení se pak emise posouvá s úbytkem vody postupně do modré oblasti, která odpovídá emisi pouze nepolárních domén. Při přidavku vody se struktura s postupující rehydratací obnovuje a emise hydrogelu pod UV-lampou je opět tyrkysová (Obrázek 17).

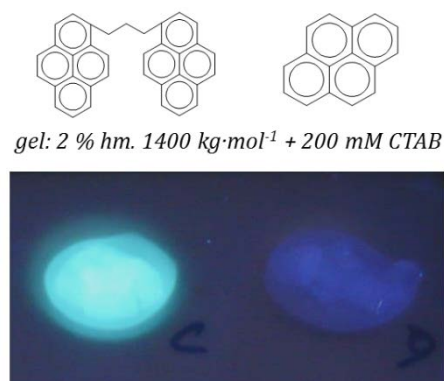
Dalším zajímavým pokusem je bližší výzkum fluidity hydrofobních domén ve fázově separovaném hydrogelu. K tomuto pokusu lze využít speciální sondu P3P

(1,3-bis(pyren-1-yl)propan), která vykazuje ve fluidním prostředí tyrkysovou excimerovou fluorescenci a v prostředí o vysoké viskozitě pak modrofialovou fluorescenci monomeru. Jak bylo pozorováno, z micelárního prostředí vykazuje P3P tyrkysovou fluorescenci. To odpovídá předpokladu vysoké fluidity micely. Zajímavějším faktem je, že shodnou fluorescenci pak vykazuje i hydrogel (Obrázek 18 vlevo nahoře), který je jinak mechanicky velmi pevný. To lze interpretovat tak, že:

- micely jsou interakcí s polymerem nezměněné,
- micely fúzíjí do větších agregátů, micelárních kanálů nebo supermicel,
- pozorovaná excimerová fluorescenci nepochází z formování vnitřního excimeru, který vyžaduje vysokou fluiditu, ale z překryvu jednotlivých pyrenylových skupin díky blízkému kontaktu a zakoncentrování.



Obrázek 18 Vizualizace vysychání a rehydratace hydrogelu pomocí viskozitní sondy P3P. Na grafu vpravo je excitační a emisní spektrum P3P a ve vloženém grafu nepublikovaná data závislosti poměru intenzity excimeru k intenzitě monomeru na viskozitě. Viskozitní řada byla připravena kombinací methanolu a glycerolu v různých objemových poměrech.



Obrázek 19 Porovnání emise P3P a pyrenu ve shodných molárních množstvích fluoroforů v prostředí fázově separovaného hydrogelu.

Pokud zvážíme možnost c), ta byla testována monomerním pyrenem. Do gelu bylo inkorporováno molárně dvojnásobné množství pyrenu než sondy P3P. Hydrofobní sondy jsou předsolubilizovány do roztoku tenzidu, který je následně smísen s roztokem polymeru. Po excitaci 365 nm vzorek gelu s P3P vykazuje tyrkysovou fluorescenci a vzorek s pyrenem fialovou fluorescenci monomeru. V tomto případě vylučujeme možnost c).

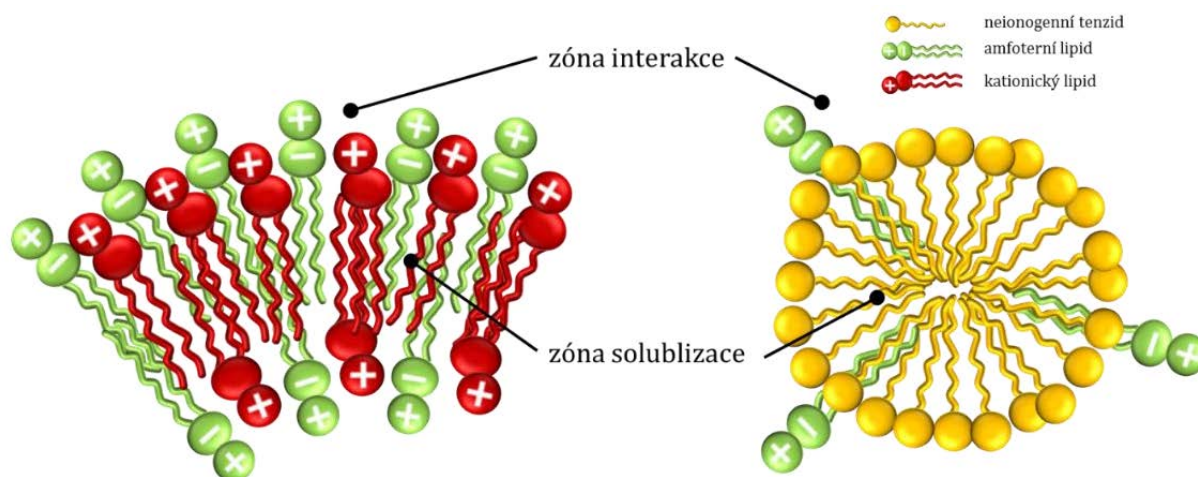
Možnost a) není příliš pravděpodobná na základě předchozích kapitol. I v případě zvýšené iontové síly pomocí nízkomolekulárního elektrolytu

dochází k interakci mezi řetězci v nízkých koncentracích obou složek a k fázové separaci ve vysokých koncentracích. Tato varianta může i mít i svou speciální verzi, kdy budeme uvažovat, že k vázání řetězců je využita jen velmi malá část tenzidu a zbylé micely se pohybují volně v disperzním prostředí bez interakce s řetězcem.

Jako nejpravděpodobnější možnost se pak jeví varianta b). K této variantě lze přidat měření pomocí sledování fluktuace fluorescence hydrofobní sondy Nilská červeň. V tomto případě pak nejsou zajímavé přímo stanovené hodnoty, ale samotný fakt, že fluktuaci lze naměřit. Vysvětlení pomocí micelární fúze je pak velmi pravděpodobné, i když nelze vyloučit i výše zmíněnou speciální variantu, kdy systém obsahuje volné micely.

#### 4.3.3 Interakce v systému polymer-lipid

V předchozích kapitolách jsme ukázali využití fluorescenční spektroskopie při studiu interakce mezi standardními jednořetězcovými kationaktivními tenzidy a hyaluronanem s diskutabilním stupněm neutralizace/disociace. Rozšířenějšímu využití těchto systémů v medicíně brání převážně tenzidová složka.



Obrázek 20 Grafická reprezentace uvažovaných směsných agregačních systémů.

Fluorescenční spektroskopie byla použita při studiu náhrady standardních tenzidů biologicky akceptovatelnými variantami. Různé přístupy shrnují publikované práce<sup>32,33,34</sup>. Metody mají společný základ v použití směsných systémů. Navrhovaná základní úvaha stojí na myšlence využití amfoterních nebo neionogenních systémů dopovaných amfifilními látkami nesoucími kladný náboj.

Fluorescence byla využita ve studiu pro potvrzení nebo vyvrácení nábojové interakce mezi fosfolipidem DPPC (dipalmitoylfosfatidylcholin) a hyaluronanem obdobně, jak bylo popsáno v kapitole 4.1. K danému množství hyaluronanu bylo přidáno

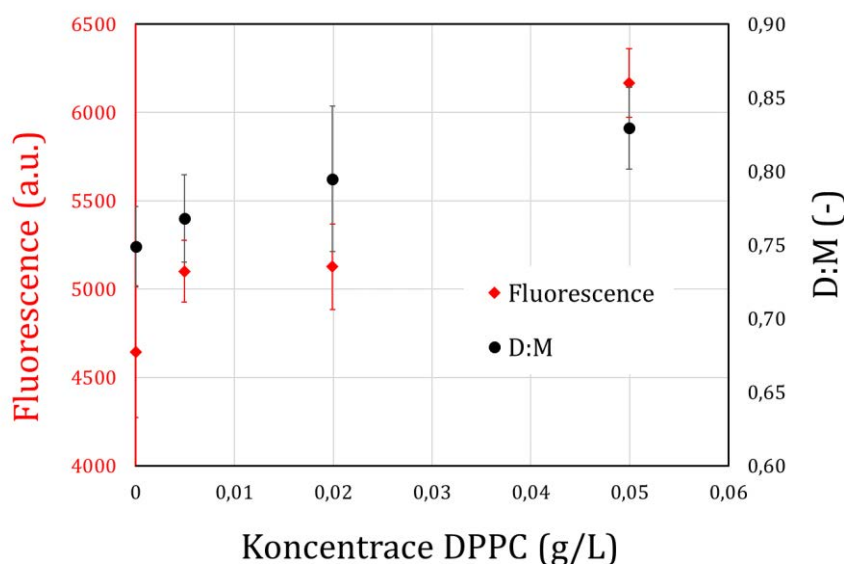
<sup>32</sup> Mravec, F.; Klučáková, M.; Pekař, M. Fluorescence Spectroscopy Study of Hyaluronan-Phospholipid Interactions. In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Burlington: Academic Press, 2011. p. 235-255. ISBN: 978-0-12-387720-8.

<sup>33</sup> Burdíková, J., Mravec, F., Pekař, M. *Colloid Polymer Sci* 294 (2016) 823-831

<sup>34</sup> Burdíková, J.; Solná, I.; Doskočil, L.; Mravec, F.; Pekař, M. *Colloid Polymer Sci* 295 (2017), 1131-1140

takové množství akridinové oranže, aby poměr P/D dosáhl hodnoty 3. Dále byl do systému přidán DPPC v konečné koncentraci 5, 20 a 50 mg·L<sup>-1</sup>, což jsou hodnoty nad stanovenou agregační (vesikulární) koncentrací pomocí pyrenových charakteristik, která je přibližně 1 mg·L<sup>-1</sup> (dle [32]).

Jak již bylo zmíněno výše, pro potvrzení interakce je vhodné sledovat nejen intenzitu fluorescence, ale zároveň poměr zastoupení dimeru k monomeru z absorpčního/excitačního spektra, jak shrnuje Obrázek 21. Zobrazená data ukazují, že v rámci chyby lze pozorovat nárůst intenzity fluorescence až při padesátinásobku stanovené agregační koncentrace. Důležitým ukazatelem je fakt, že tento nárůst nelze připsat rozpadu dimerů, ale naopak dochází spíše k nárůstu poměru D:M. V tomto případě můžeme tedy takřka vyloučit, že by mezi DPPC a hyaluronanem šlo o nábojovou interakci. Jedno z možných vysvětlení je, že interakce mezi fosfolipidovým agregátem (liposomem) pro řetězec hyaluronanu nedostupná ze sterických důvodů, případně že liposomy z DPPC vykazují velmi nízký negativní zeta-potenciál mezi -1 až -2 mV<sup>35</sup>.



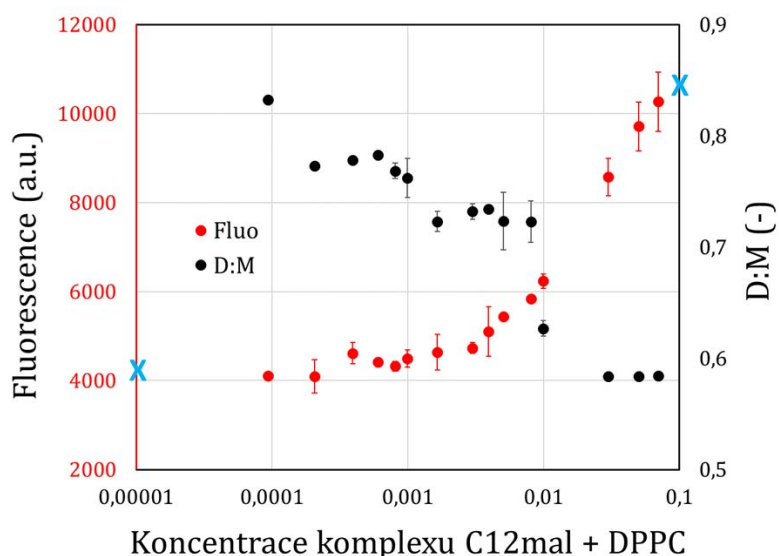
Obrázek 21 Závislost intenzity fluorescence a poměru dimer:monomer z emisního, respektive absorpčního spektra akridinové oranže v přítomnosti hyaluronanu (P/D = 3) za rostoucí koncentrace fosfolipidu DPPC. Data dle [32], doplněna.

Velmi zajímavé výsledky dostaneme, pokud necháme interagovat neionogenní micelární systém dopovaný DPPC. Zvolíme-li například jako neionogenní systém dodecylmaltosid, potřebujeme znát, kolik molekul tenzidu tvoří jednu micelu. K tomu lze opět využít fluorescenční spektroskopii, když stanovíme závislost zhášení pyrenu cetylpyridinium chloridem, ze které lze určit agregační číslo micely dodecylmaltosidu [33]. K takovéto micely bylo přidáno takové množství DPPC, aby molární poměr  $n_{\text{DPPC}}/n_{\text{micel}}$  byl mezi 1 a 1,5. Takto připravený systém přidáváme opět k hyaluronanu s nasorbovanou akridinovou oranží a výsledek shrnuje Obrázek 22.

<sup>35</sup> Různí autoři, například Henriksen, I. et al. *Int J Pharma* 101 (1994), 227-236



Data z experimentu s komplexem ukazují, že „rozředění“ amfoterního fosfolipidu v neionogenní micelle přineslo z pohledu fluorescence úspěch ve formě nárůstu fluorescence doprovázená poklesem zastoupení dimeru. V tomto případě lze považovat interakci mezi hyaluronanem a komplexem jako elektrostatickou.



Obrázek 22 Závislost intenzity fluorescence a poměru dimer:monomer z emisního, respektive absorpčního spektra akridinové oranže v přítomnosti hyaluronanu ( $P/D = 3$ ) za rostoucí koncentrace komplexu dodecyl maltosidu a DPPC v molárním poměru 98:1. Modré křížky indikují výchozí hodnoty fluorescence a D:M pro systém bez přídavku komplexu.

Chování směsných systémů lze popsat velmi komplexně pomocí dalších fluorescenčních technik a sond. Směs amfoterního fosfolipidu DPPC a kationaktivního lipidu DPTAP (1,2-dipalmitoyl-3-trimetylamonium-propan) byla popsána nejen pomocí pyrenu z hlediska agregace, ale byly využity i anizotropní difenylhexatrien pro studium stupně organizace lipidové vrstvy (Lipid Order Parameter) a polaritní Laurdan, pro stanovení fázového přechodu lipidů ze změny přítomnosti vody v nejbližším okolí [34].

#### 4.4 Fluorescentní částice

Pokročilé mikroskopické techniky byly využity ve studiu dvou odlišných koloidních systémů – nanodiamantů s dusíkovými vakancemi<sup>36</sup> a kvantových teček<sup>37</sup>.

##### 4.4.1 *Nanodiamanty*

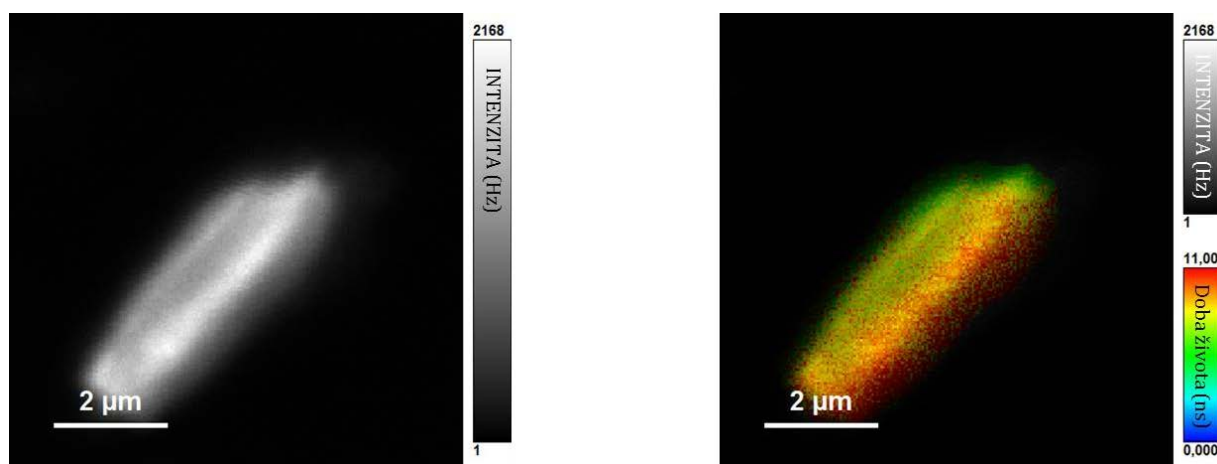
Velmi rozsáhlá, teoretická i experimentální, studie pracoval s modelováním, přípravou a stanovením magnetických a optických vlastností nanodiamantů s N-vakancemi a různým způsobem terminace. Fluorescenční spektroskopie, ve formě časově rozlišené fluorescenční mikroskopie (FLIM), byla využita pro stanovení dob života

<sup>36</sup> Kratochvílová, I.; Šebera, J.; Ashcheulov, P.; Golan, M.; Ledvina, M.; Míčová, J.; **Mravec, F.**; Kovalenko, A.; Zverev, D.; Yavkin, B.; Orlinskii, S.; Záliš, S.; Fišerová, A.; Richter, J.; Šefc, L.; Turánek, J. *J Phys Chem C* 118 (2014), 25245-25252

<sup>37</sup> Nejd, L.; Zítka, J.; **Mravec, F.**; Milosavljević, V.; Zítka, O.; Kopel, P.; Adam, V.; Vaculovičová, M. *Microchim Acta* 184 (2017), 1489-1497.

excitovaného stavu těchto systémů v pevném stavu. Pro rozsáhlost této studie se v publikaci objevily pouze shrnuté výsledky popisující jednotlivé experimenty.

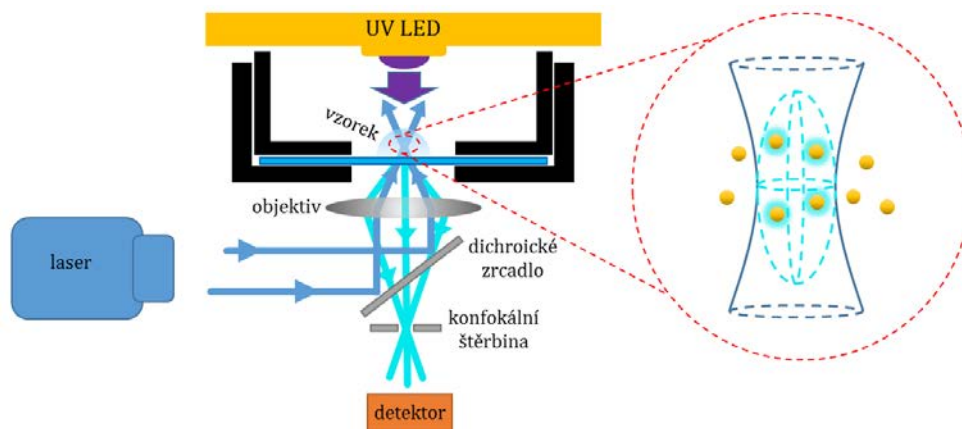
Obrázek 23 zachycuje emisi agregátu nanodiamantu (oxidovaný a žíhaný) při excitaci 375 nm fluorescence byla zaznamenávána spektrálně od 405 nm. Jak lze vidět, v tuhém stavu jsou nanodiamanty agregované v různě velkých útvarech, což sťažuje jejich praktickou aplikovatelnost a zahrnuje pro značení buněk další, dezintegrační, krok.



Obrázek 23 Obrázky agregátu nanodiamantů získané pomocí FLIM. Vlevo je obrázek interpretován pouze v intenzitním rozsahu, vpravo pak v kombinaci s rozsahem dob života.

#### 4.4.2 Kvantové tečky

Kvantové tečky patří již dlouhou dobu k oblíbeným fluoroforům. Lze je připravit z různých prekurzorů například pomocí UV záření za stabilizačního efektu 2-sulfanylbutandiové kyseliny.



Obrázek 24 Schématická reprezentace uspořádání experimentu pro stanovení temporálních a difúzních parametrů při fotogeneraci kvantových teček.

Pomocí Fluorescenční korelační spektroskopie byl studován vznik a změna emisních a difúzních vlastností u systému Cd:Se. Jako první bylo potřeba systém nastavit pomocí měření již vytvořených kvantových teček pro správné určení doby života, difúzního koeficientu a koncentrace vznikajících QD. Je tedy nutné stanovit parametry

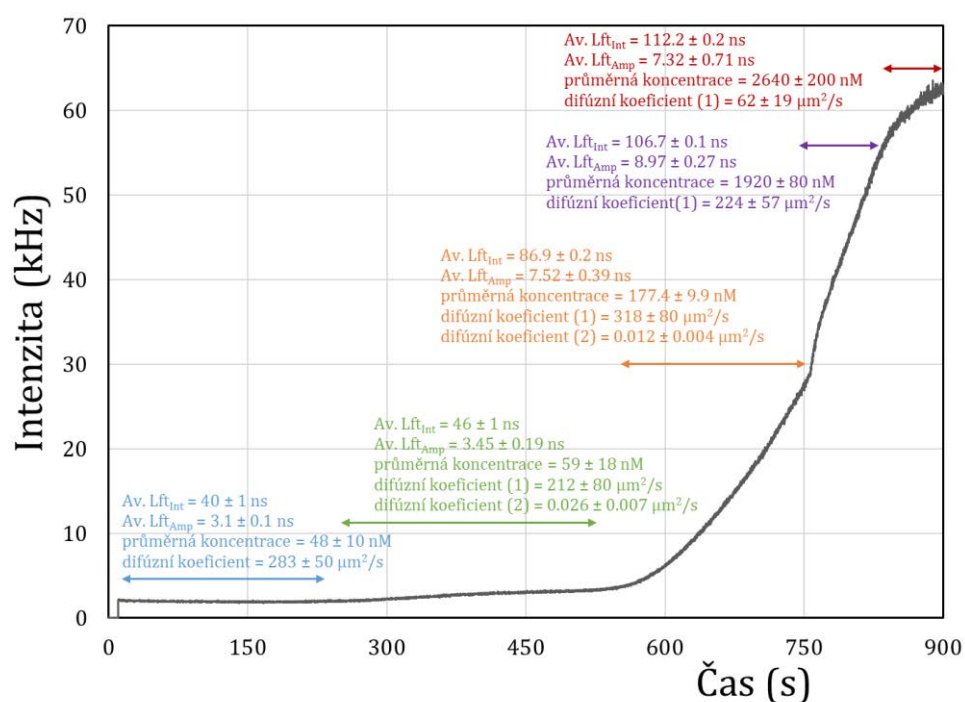
konfokálního objemu, nastavit počet fotonů dopadající na detektor<sup>38</sup> a stanovit frekvenci excitačního pulzu laserové hlavičky pro správné stanovení doby života. K nastavení tohoto systému se tak přistupuje iterativně.

Obdobně obtížným úkolem je pak i fyzická příprava experimentu, neboť pro správnou genezi kvantových teček je potřeba vlnové délky  $\sim 250$  nm. Protože jádrem systému je epifluorescenční inverzní mikroskop, bylo přistoupeno k iluminaci seshora. Malé množství roztoků prekursorů bylo umístěno na krycí sklíčko a nad něj byla umístěna iluminační dioda. Celková vzdálenost nepřesáhla 1 cm. Situace je schematicky zobrazena na následujícím obrázku (Obrázek 24).

Obrázek 25 shrnuje obdržená data při monitorování geneze kvantových teček a ukazuje i široké možnosti multiparametrické analýzy. Tento experiment tak ukazuje, že i přes složitější a časově náročnější adaptaci měřic soustavy pro daný experiment, je fluorescence velmi elegantním a silným nástrojem pro stanovení koloidních i luminiscenčních vlastností.

#### 4.5 Biokoloidní systémy

Fluorescence ve formě fluorescenční mikroskopie je zásadním vědeckým nástrojem ve studiu buněk. Celou kapitolu by zabral asi jen výčet technik, které se používají pro zobrazování, detekci nebo studium těchto živých systémů (sekvenace DNA, DNA čipy, průtoková cytometrie, microscale thermophoresis, imunologie,...).

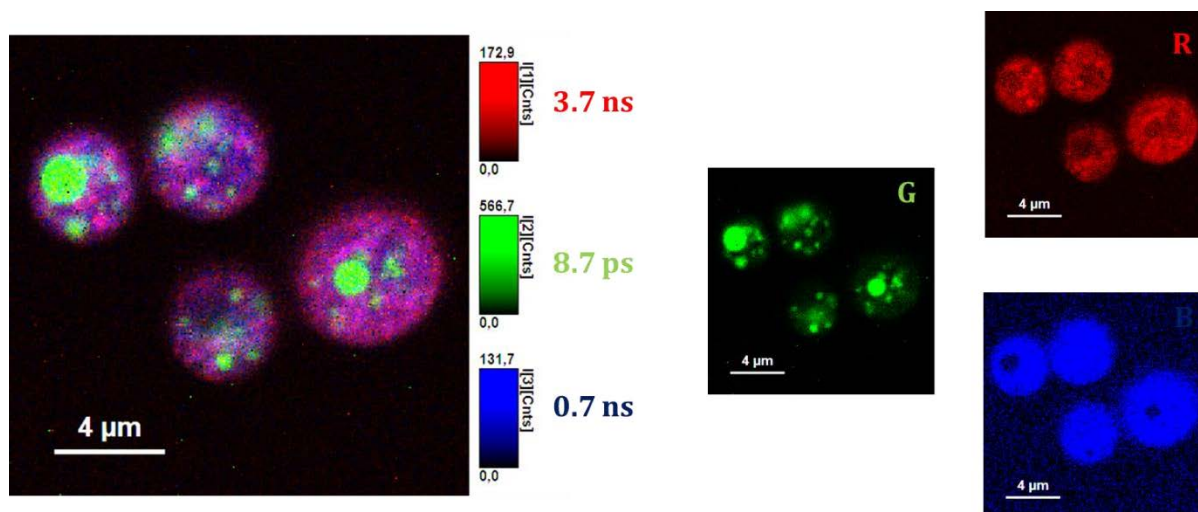


Obrázek

<sup>38</sup> Použité detektory mají své omezení, kdy při celkové intenzitě  $2 \cdot 10^6$  fotonů  $\cdot \text{s}^{-1}$  se vypínají. Celkovou intenzitu ovlivňuje mimo jiné i frekvence laserové hlavičky, která úzce souvisí se stanovitelným rozsahem dob života.

Ve výzkumu se používá buď fluorescence přirozeně se vyskytujících látek, nebo cílené vybarvování. Obrázek 26 ukazuje kompozitní RGB obrázek získaný z analýzy FLIM kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* a jednotlivé barevné kanály, které přísluší typickým časům získaným z globální fitovací analýzy. Ta sečte časové informace ze všech bodů obrázku do jedné vyhasínací křivky. Při excitaci 467 nm v rozsahu emisních vlnových délek  $520 \pm 35$  nm jsou nalezeny tři časy, z nichž dva delší odpovídají různým formám flavinů (riboflavin, flavinmononukleotid, flavinadenindinukleotid) a poslední, velmi krátký, pak karotenoidům.

Při studiu živých systémů je obecně nutné použít složitější přístup. Je nutné získat z jednoho skenu tvarové a funkční informace. Tato nutnost vyplývá například z fotovybělování nebo obtížného způsobu fixace, kdy je malé množství bakteriální suspenze, typicky 50 uL, převrstveno a promícháno s horkým 2-3% roztokem agarózy na krycím skle



Obrázek 26 Kompozitní RGB obrázek autofluorescence *C. capitatum* z FLIM analýzy. Zelený kanál zobrazuje fluorescenci karotenoidů.

#### 4.5.1 Strukturní studie

Metoda fluorescenční sondy v kombinaci s FLIM byla využita při studiu akumulace zásobního polymeru polyhydroxyalkanoátu (PHA) v bakteriích *Cupriavidus necator* H16 při kultivaci s porovnáním s neprodukcčním mutantem *C. necator* PHB-4<sup>39</sup>.

Pro vizualizaci vnějších vrstev bylo přistoupeno k využití modrého (červená excitace, červená emise) amfifilního barviva DiD<sup>40</sup>, které neprochází přes vnější vrstvy. DiD<sup>40</sup> lze ovšem excitovat i vlnovou délkou pro excitaci Nilské červeně. Proto bylo přistoupeno ke kombinaci spektrálního časového rozlišení se střídající se excitací (PIE, pulsed-interleaved excitation). Při excitaci se střídaly zelený a červený laser s frekvencí 20 MHz, signál byl rozdělený na dva detektory ve spektrálních oblastech žlutá

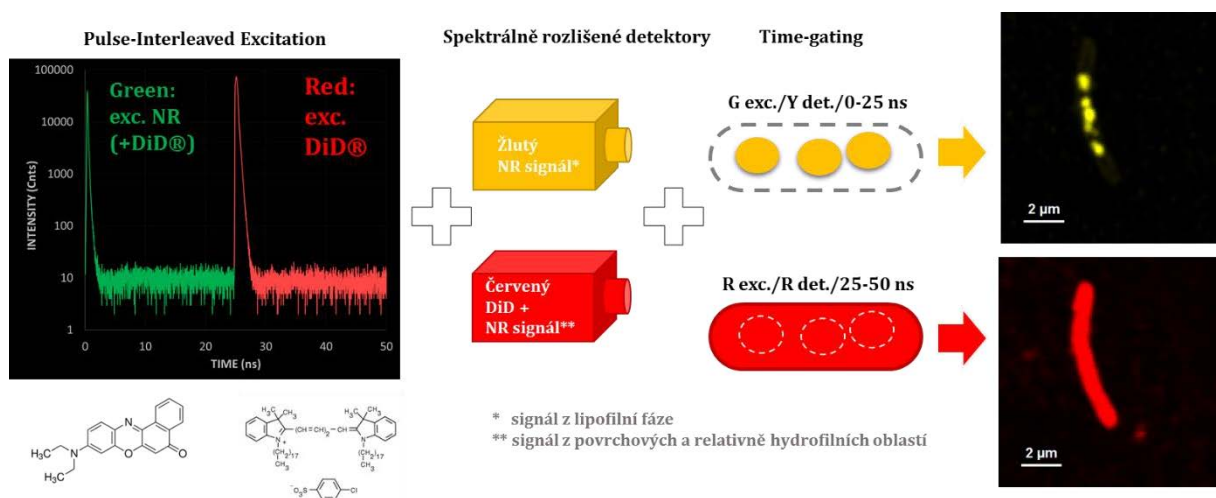
<sup>39</sup> Mravec, F.; Obruča, S. et al. *FEMS Microbiol Lett* 363 (2016), 1-6.

<sup>40</sup> 1,1'-Dioktadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodikarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonát

550 ± 49 nm a červená 690 ± 70 nm. Žlutý signál byl detekován mezi 0-25 ns, červený mezi 25-50 ns. Tak bylo docíleno, že jeden z kanálů zobrazoval pouze emisi z granulí a druhý obrýs bakterie.

Situaci shrnuje Obrázek 27. Dalším zajímavým výsledkem je intenzitní profil vybarvené granule, který lze proložit Gaussovou křivkou. Takové rozložení znamená, že lipofilní barvivo probarvilo celou granuli a není zachyceno jen na povrchu.

Výsledky získané pomocí fluorescenční mikroskopie jsou v dobré shodě se zjištěnými výsledky pomocí elektronové mikroskopie a pomohly zjistit, že maximální objemové procento granulí je okolo 40 %.



Obrázek 27 Přehled nastavení experimentu pro stanovení zastoupení granulí PHA v bakteriích. Adaptováno dle [39].

#### 4.5.2 Studie cytoplazmy

Pokud jsou buňky vystaveny stresu jako teplota/chlad nebo hypertonicnému/hypotonicnému prostředí, můžou být ovlivněny vlastnosti cytoplazmy. Z důležitých vlastností cytoplazmy mohou být ovlivněny viskozita nebo pH případně i koncentrace nízkomolekulárních elektrolytů. Tímto mohou být ovlivněny transportní vlastnosti cytoplazmy nebo elektrostatické interakce látek v cytoplazmě interagující.

Pro studium fyzikálně-chemických vlastností cytoplazmy se využívají např. příslušné sondy reagující na pH, chelatační činidla pro ionty či „trackery“ pro sledování dělení. Je zároveň mnoho technik, jak dostat fluoreskující činidlo do buněk<sup>41</sup>.

Tento přístup byl použit ve studii dopadu hypertonicného prostředí na bakterie produkující granule (*C. necator* H16) a mutantní kmen (*C. necator* PHB-4)<sup>42</sup>. Fluorescenční mikroskopie byla jedna z technik zahrnující elektronové mikroskopie, Ramanova

<sup>41</sup> ATP, pinocytóza, elektroporace, fúze s kationickými lipidy, fúze s červenými krvinkami, mikroinjekce, bombardování mikroprojektily, skleněné kuličky, ultrasonifikace, ... viz. Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition, ISBN: 0982927916

<sup>42</sup> Obruča, S., Sedláček, P., Mravec, F. et al. *New Biotechnol* 39 (2017), 68-80

spektroskopie, plynová chromatografie a thermogravimetrie. Výsledky z fluorescenční části výzkumu ukázaly rozdíly mezi H16 a PHB-4 v reakci na hypertonické prostředí. Zatímco průměrné pH u obou kmenů je bez větších rozdílů ve standardním prostředí (7,4-7,5), v hypertonickém prostředí je pokles pH výraznější u neproduktivního kmene PHB-4. To by mohlo ukazovat na protržení buněčné membrány a rychlejší rozvrat neproduktivního PHB-4. FLIM obrázky také ukazují jednotlivé PHB-4 bakterie velmi neostře s difúzními okraji v hypertonickém prostředí ve srovnání s prostředím standardním.

Mapování viskozity přineslo v chování obou kmenů rozdílné výsledky a podpořilo interpretaci změny pH. Vliv hypertonického prostředí znamenal zvýšení hodnoty anisotropie u H16 a pokles u PHB-4, což by šlo vysvětlit tak, že u H16 došlo k zahuštění vnitřního prostředí v důsledku osmózy a u PHB-4 k protržení membrány a rozředění vnějším prostředím. Pozoruhodný fakt je, že ve standardním prostředí vykazuje anisotropie sondy BCECF vyšší hodnotu u PHB-4 než H16. Toto může souviset s myšlenkou lokalizace sondy nebo hydrolytického aparátu, který umožňuje vyšší rotační pohyb sondy u H16 než u PHB-4.

Obdobně lze pohlížet i na rozložení intenzity fluorescence u FLIM obrázků. Zatímco je u PHB-4 intenzita rozložena víceméně rovnoměrně v celé bakterii, u H16 jsou vidět místa s vyšší a nižší intenzitou. Jedním z možných vysvětlení je rozdílné místo, kde probíhá hydrolyza esteru fluorescenční sondy. U PHB-4 by to pak znamenalo, že hydrolyza probíhá u buněčné membrány, u H16 v mezigranulárním prostoru nebo na povrchu granule.

#### 4.5.3 UV protektivita

Fluorimetr lze použít i jiným způsobem než jen k měření emisních/excitačních vlastností. Geometrie fluorimetru, kdy je excitační a detekční systém vůči sobě v úhlu 90°, umožňuje sledovat například rozptýlené světlo. Tuto techniku je možno brát jako variantu nefelometrie, kdy je pozorován Tyndallův jev<sup>43</sup>. Tato technika byla použita při studiu rozptylujících vlastností PHB granulí<sup>44</sup>. Jeden z myšlených důsledků přítomnosti granulí je ochrana buněčných systémů proti UV záření. Tato myšlenka byla testována kultivačními testy, průtokovou cytometrií pro stanovení Reaktivních forem kyslíku a rozptylovými technikami. Pokud porovnáme při shodném nastavení přístroje a shodné absorbanci vzorku kmen H16 a PHB-4, zjistíme, že rozptyl H16 je výraznější než u PHB-4 a to nejvíce právě v UV oblasti. To by potvrzovalo zjištěné výsledky, kdy kmen H16 vykazoval v dalších testech vyšší odolnost proti UV záření než bez granulí kmen PHB-4.

---

<sup>43</sup> Rozptyl světla na koloidních (a větších) částicích.

<sup>44</sup> Slaninova, E., Sedlacek, P., Mravec, F. et al. *Appl Microbiol Biotechnol* 102 (2018), 1923–1931

## 5 ZÁVĚR

Tato habilitační práce se zabývá využitím vybraných fluorescenčních technik ve studiu různě komplexních koloidních systémů – od roztoků polymerů po mikroorganismy. Na praktických příkladech bylo ukázáno, že fluorescenční techniky od spektroskopických po mikroskopické jsou velmi silným nástrojem pro výzkum živé i neživé přírody. Množství technik se neustále rozvíjí, zvláště pak v oboru vysoce rozlišené mikroskopie, a množství fluorescenčních sond a značek pro různé aplikace je obrovské.

Uvedené praktické příklady neměly ukázat jen šíři fluorescenčních technik dostupných v rámci Fakulty chemické, ale zabývaly se i hlubší interpretací již publikovaných výsledků. Správná interpretace získaných dat se dá totiž považovat za nejsložitější část použití fluorescenčních technik a to především v případě, kdy pozorované struktury nevykazují vlastní fluorescenci. Obtížnost interpretace naměřených dat lze snížit, pokud je dostupných více technik. Jako vhodným, ne-li rovnou nezbytným, doplňkem stacionární fluorescenční spektroskopie je dynamická časově rozlišená spektroskopie nebo obdobně dynamická technika měření fluorescenční anisotropie (byť je většinou pořizována ve stacionárním módu). Pokud je k dispozici i mikroskopická technika fluktuální spektroskopie (např. FCS), jsou pak dostupné veškeré charakteristiky daného fluoroforu – interakce v excitovaném stavu a mobilita v daném prostředí.

Tento souhrnný přehled pak také ukazuje, že je zde velmi široké pole pro rozvoj dalších technik na FCH VUT, které nebyly v práci zmíněné, ale ve kterých pokračuje výzkum

## 6 ABSTRACT

This habilitation thesis deals with the use of selected fluorescence techniques in the study of variously complex colloidal systems - from polymer solutions to microorganisms. Practical examples have shown that fluorescence techniques from spectroscopic to microscopic are a very powerful tool for research into both living and inanimate nature. A number of techniques are constantly evolving, especially in the field of high resolution microscopy, and the amount of fluorescent probes and markers for different applications is huge.

These practical examples should not only show the breadth of fluorescence techniques available within the Faculty of Chemistry, but also deal with deeper interpretation of published results. The correct interpretation of the obtained data can be considered the most complicated part of the use of fluorescence techniques, especially when the observed structures do not exhibit their own fluorescence. The difficulty of interpreting the measured data can be reduced if more techniques are available. A suitable, if not necessary, complement to stationary fluorescence spectroscopy is dynamic time resolved spectroscopy or a similarly dynamic technique for measuring fluorescence anisotropy (although it is usually acquired in stationary mode). If a microscopic fluctuation spectroscopy technique (eg, FCS) is available, then all the characteristics of the fluorophore - the excited interaction and the mobility in the environment - are available.